



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM KAROTENOGENNÍCH KVASINEK V PRŮBĚHU
RŮSTU POMOCÍ POKROČILÝCH INSTRUMENTÁLNÍCH
TECHNIK**

STUDY OF CAROTENOGENIC YEASTS DURING GROWTH BY USING ADVANCED INSTRUMENTAL
TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martin Vaněk

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0999/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Martin Vaněk**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Studium karotenogenních kvasinek v průběhu růstu pomocí pokročilých instrumentálních technik

Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

- 1) kultivace vybraných druhů/kmenů karotenogenních kvasinek
- 2) komplexní charakterizace metabolické aktivity buněk kvasinek průběhu jednotlivých růstových fází se zvláštním zaměřením na lag fázi růstu
- 3) sledování změn koncentrace vybraných metabolitů v buňkách i subbuněčných frakcích kvasinek pomocí pokročilých instrumentálních metod
- 4) posouzení získaných výsledků z hlediska biotechnologického využití kvasinek

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Martin Vaněk
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá využitím pokročilých fluorescenčních technik při získávání poznatků o průběhu kultivace karotenogenních kvasinek. Zkoumá možnosti průtokové cytometrie při měření autofluorescence a kvantifikaci karotenoidů. Ukázalo se, že dokud jsou karotenoidy ukládány do membránových struktur, je metoda použitelná. Ovšem v průběhu stacionární fáze karotenogenní kvasinky vždy začnou ukládat karotenoidy i do lipidických granulí, a tehdy metoda selhává. Dále byly zkoumány možnosti průtokové cytometrie pro stanovení velikosti buněk a obsahu lipidů. Dokud buňky nehladoví, tedy není vyčerpán substrát v médiu, tak tato měření vysoce korelují s obsahem lipidů dle plynové chromatografie. Nutností je ovšem sestavení kalibrace pro každý kvasničný druh zvlášť, aby byla vystižena specifika vnitrobuněčné stavby.

Další zkoumanou metodou byla fluorescenční mikroskopie se schopností časově rozlišené detekce, umožňující ve vzorku pozorovat odlišné spíše sloučeniny, v závislosti na rozdílných prostředích, ve kterých se nachází. Pomocí této metody byly pozorovány a kvantifikovány změny buněčných lipidických struktur (membrán, lipidických granulí) a nalezeny souvislosti s přizpůsobováním se podmínkám prostředí. Zvyšování koncentrace karotenoidů a/nebo zvýšení rigidity membrán dochází tehdy, když buňka přechází z jednoho růstového a metabolického stádia do druhého a potřebuje chránit intracelulární obsah během takové změny.

Klíčová slova: karotenoidy, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Sporobolomyces shibatanus*, průtoková cytometrie, fluorescenční mikroskopie s časově rozlišenou fluorescencí

SUMMARY

This work is dealing with application of advanced fluorescence techniques for gaining knowledge about culture development during fermentation of red yeasts. Flow cytometry was used for auto-fluorescence measurement and carotenoids quantitation. It was resolved that while carotenoids are stored mainly in membranes the technique was feasible. If red yeast starts to accumulate carotenoids into lipid bodies mainly throughout the course of stationary phase, then the method starts to fail. Flow cytometric method using cell size measurement and light scatter for lipid quantitation was proved as applicable, too. However, it works only if cells are not starved. Individual calibration for each species is needed for elimination inter-species variations of intracellular structures.

Fluorescence lifetime imaging microscopy was also used for studying of red yeast. Inherent ability to resolve different fluorescent species of the same molecule, which arise due to different molecular environment, helps with quantitation of cellular lipidic structures changes through the course of fermentation. Increase in the levels of carotenoids and/or rigidity of membranes was found as mechanism of protection during metabolic shifts, when intracellular content is vulnerable to damage.

Keywords: carotenoids, *Cystofilobasidium capitatum*, *Cystofilobasidium macerans*, *Sporobolomyces shibatanus*, flow cytometry, time resolved fluorescence microscopy

VANĚK, M. *Studium karotenogenních kvasinek v průběhu růstu pomocí pokročilých instrumentálních technik*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 114 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být užita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH.

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za odborné vedení a rady v průběhu práce. Dále chci poděkovat Ing. Daně Byrtusové. a Ing. Filipovi Mravcovi, PhD. za velkou pomoc v průběhu experimentální části práce. V neposlední řadě velké díky patří mé manželce Daniele, za její trpělivost a péči během dlouhých dnů i nocí v laboratoři.

Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Kvasinky	11
2.2	Vybraná specifika stavby kvasinkových buněk	11
2.2.1	Vakuoly.....	11
2.2.2	Buněčná stěna	11
2.2.3	Lipidická tělíska	12
2.3	Karotenoidní kvasinky	12
2.3.1	Rod Rhodotorula.....	13
2.3.2	Rod Sporobolomyces.....	14
2.3.3	Rod Phaffia	14
2.3.4	Rod Cystofilobasidium	15
2.4	Fáze růstu mikrobiální kultury	15
2.4.1	Lag fáze	16
2.5	Karotenoidy.....	18
2.5.1	Biosyntéza karotenoidů	18
2.5.2	Současná a budoucí použití karotenoidů	19
2.5.3	Přehled nejvíce zkoumaných karotenoidů	19
2.6	Lipidy.....	21
2.6.1	Biosyntéza lipidů a mastných kyselin	22
2.7	Fluorescence	22
2.7.1	Fosforescence	22
2.7.2	Fluorescence	23
2.7.3	Autofluorescence	24
2.7.4	Časově rozlišená fluorescence a kvantové výtěžky.....	24
2.7.5	Fluorescenční mikroskopie zobrazování dob života	25
2.8	Metody studia buněk a buněčných metabolitů.....	27
2.8.1	Turbidimetrické stanovení sušiny (absorpční spektrofotometrie)	27
2.8.2	Gravimetrické stanovení sušiny.....	27
2.8.3	Průtoková cytometrie.....	27
2.8.4	Stávající využití průtokové cytometrie při studiu kvasinek	28
2.8.5	Fluorescenční mikroskopie.....	29

2.8.6	Fluorescenční mikroskopie kvasinek.....	29
2.8.7	Extrakce	30
2.8.8	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	31
2.8.9	Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID) ..	32
3	CÍL PRÁCE	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
4.1	Chemikálie a složky kultivačních médií	34
4.2	Přístroje a pomůcky	34
4.2.1	Kultivace kvasinek a stanovení biomasy	34
4.2.2	Izolace a analýza karotenoidů.....	34
4.2.3	Plynová chromatografie.....	35
4.2.4	Fluorescenční metody	35
4.3	Mikroorganismy	35
4.4	Příprava a měření modelových systémů	35
4.5	Kultivace v průtokové komoře.....	35
4.6	Kultivace <i>Cystofilobasidium capitatum</i> ve zkumavkách.....	36
4.7	Fermentorová kultivace <i>Cystofilobasidium capitatum</i>	37
4.8	Fermentorové kultivace <i>Cystofilobasidium macerans</i> a <i>Sporobolomyces shibatanus</i>	37
4.9	Analýza vzorků z fermentorů pomocí průtokové cytometrie	38
4.10	FLIM snímkování vzorků z fermentorů.....	38
4.11	Izolace lipidů.....	39
4.12	Analýza karotenoidů pomocí HPLC	39
4.13	Analýza mastných kyselin pomocí GC-FID	39
4.14	Stanovení reziduálních cukrů v mediu dle Duboise.....	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	41
5.1	Studium modelových systémů	41
5.2	Kultivace v průtokové komoře s průtokem média	45
5.3	Kultivace v průtokové komoře na pevném mediu	47
5.4	Kultivace <i>Cystofilobasidium capitatum</i> ve zkumavkách.....	50
5.5	Fermentorová kultivace <i>Cystofilobasidium capitatum</i>	54
5.5.1	Využití průtokové cytometrie ke sledování průběhu fermentace <i>C. capitatum</i>	57
5.5.2	Stanovení karotenoidů pomocí HPLC, stanovení mastných kyselin pomocí	

GC a porovnání s časovými profily získanými pomocí průtokového cytometru.....	61
5.5.3 FLIM snímkování <i>C. capitatum</i> v průběhu fermentace.....	66
5.6 Fermentorová kultivace <i>Cystofilobasidium macerans</i>	69
5.6.1 Průtoková cytometrie v průběhu fermentace <i>C. macerans</i>	72
5.6.2 Stanovení karotenoidů pomocí HPLC, stanovení mastných kyselin pomocí	
GC a porovnání s časovými profily získanými pomocí průtokového cytometru.....	77
5.6.3 FLIM snímkování <i>C. macerans</i> v průběhu fermentace	81
5.7 Fermentorová kultivace <i>Sporobolomyces shibatanus</i>	85
5.7.1 Průtoková cytometrie v průběhu kultivace <i>S. shibatanus</i>	85
5.7.2 Stanovení karotenoidů pomocí HPLC, stanovení mastných kyselin pomocí	
GC a porovnání s časovými profily získanými pomocí průtokového cytometru.....	89
5.7.3 FLIM snímkování <i>S. shibatanus</i> v průběhu fermentace	93
5.8 Shrnutí fermentorových kultivací a zjištěných poznatků.....	98
6 Závěr.....	102
7 Bibliografie	104
8 Seznam použitých zkratk	112
9 Příloha 1.....	113

1 ÚVOD

Tato práce se zabývá využitím pokročilých fluorescenčních technik při získávání poznatků o průběhu kultivace karotenogenních kvasinek. Ty jsou z průmyslového hlediska zajímavé jako producenti SCO („single cell oils“) s potenciálně vyšším obsahem vícenenasycených mastných kyselin a také karotenoidů. Karotenoidy mají a mohou v budoucnu mít mnohá užití, ať už se jedná o „klasické“ užití v potravinářství jako barviva nebo jako doplňky výživy a krmiv, ale také se mohou stát součástí biodegradabilní a konzumovatelné elektroniky a fotočlánků.

Průtoková cytometrie patří mezi metody s potenciálem tzv. on-line analýzy, která zásadním způsobem rozšiřuje možnosti řízení biotechnologického procesu, díky čemuž lze dosáhnout podstatných úspor vedoucích ke zlevnění biotechnologických produktů a tedy ke zvýšení jejich konkurenceschopnosti. V předložené práci jsou zkoumány možnosti průtokové cytometrie pro stanovení biomasy, karotenoidů a lipidů a tyto jsou diskutovány s ohledem na výstupy získané pomocí klasických metod analýzy metabolitů – plynové a kapalinové chromatografie – a s ohledem na zjištění týkající se proměn vnitrobuněčné koncentrace a distribuce karotenoidů získaných pomocí fluorescenční mikroskopie zobrazování dob života.

Fluorescenční mikroskopie zobrazování dob života využívá vysoce citlivé elektroniky schopné časově rozlišené detekce dopadu fotonů na detektor v kombinaci s konfokální optikou a vysokofrekvenčními lasery jako excitačním zdrojem. Umožňuje v jednom snímku rozlišovat několik specií téže molekuly, lišící se prostředím, ve kterých se nacházejí. Interakce s prostředím ovlivňuje dobu života vyhasínání fluorescence a ta je během těchto měření vyhodnocována. V jedné buňce tak např. může být rozlišeno hned několik variant molekul karotenoidů, lišících se právě prostředím, ve kterém se nacházejí – pH, viskozitou, apod. V průběhu kultivace kvasinek lze tyto změny v jednotlivých kompartmentech buněk zaznamenávat a určit tak, k čemu a kdy dochází, jakým způsobem kvasinky zacházejí s karotenoidy a kdy, kde a za jakým účelem je využívají. Konfokální optika v kombinaci s piezoelektrickým skenerem a algoritmy pro zpracování obrazu pak umožňuje excelentní možnosti lokalizace jednotlivých specií. Fluorescenční mikroskopie zobrazování dob života tak umožňuje jedinečný vhled do změn v metabolismu karotenoidů a lipidů a přibližuje se k této problematice z dosud neprobádaného směru na úrovni jedné buňky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofními organismy z říše Houby (Fungi), jejichž morfologie je rozmanitá a obvykle souvisí s metabolismem. Morfologie je tak ovlivněna kultivačním prostředím (vnější podmínky) i růstovou fází [1]. Elipsoidní a kulovitý tvar jsou nejběžnější, nicméně lze pozorovat i tvary protáhlé, válcovité. Exotických tvarů nabývají například kvasinky rodu *Trigonopsis*, jejichž buňky jsou trojúhelníkového tvaru [2].

Kvasinky jsou průmyslově využívány především pro svou schopnost zkvašovat substráty za produkce specifického produktu (ethanol, lipidy, karotenoidy, vlastní biomasa). Nejznámějším využitím je zkvašování cukernatých substrátů kvasinkami rodu *Saccharomyces cerevisiae* za účelem produkce ethanolu, případně kvasničné biomasy (pekařské droždí, krmné droždí).

Kvasinky také mohou sloužit jako modelový eukaryotický organismus – vybavený všemi regulačními prvky typickými pro eukaryotickou buňku, zároveň snadno kultivovatelný.

2.2 Vybraná specifika stavby kvasinkových buněk

2.2.1 Vakuoly

Vakuoly jsou oválné a kulovité organely uvnitř cytoplasmy kvasinek, ohraničené jednoduchou fosfolipidovou membránou. U mladých buněk lze najít množství menších vakuol, které se se stárnutím buňky zvětšují a splývají, někdy mohou vyplňovat takřka celý objem buňky [2]. Vakuoly slouží jako buněčný sklad aminokyselin, polyfosfátů (volutin) a kationtů kovů [1]. Jsou místem nespecifického štěpení buněčných proteinů, účastní se tak cyklu aminokyselin v buňce. Dále obsahují hydrolázy, esterázy, ribonukleázy a sehrávají tak důležitou úlohu při recyklaci buněčných komponent.

2.2.2 Buněčná stěna

Kvasinky mají poměrně výraznou buněčnou stěnu (100 – 200 nm), tvořící ve stacionární fázi 15-25% suché hmotnosti a výrazně zvyšující mechanickou odolnost buněk. Obzvláště u některých rodů je její masivnost v kombinaci se složením opravdu výraznou překážkou při izolaci intracelulárních metabolitů a tedy i pro samotné biotechnologické využití. Toto je bohužel případ i karotenogenních kvasinek. Z toho důvodu je velmi potřebné se zabývat stavbou jejich buněčné stěny (BS) a možnostmi jejího rozrušení.

Hlavní složkou buněčných stěn kvasinek jsou polysacharidy (až 90%) glukany a manany, v menší míře chitin [1]. Nezbytnou součástí jsou také proteiny, ale vyskytují se i lipidy a fosfolipidy [2]. Složení buněčných stěn je pochopitelně proměnlivé v závislosti na podmínkách kultivace a stáří kultury.

U červených kvasinek (vesměs basidiomycet) je BS tvořena složeným polysacharidem glukomananem a chitin je důležitou stavební složkou (u askomycet se vyskytuje především v jizvách po pučení) [3]. Glukomanázy nejsou obvyklými lytickými enzymy, běžné komerční směsi je neobsahují.

2.2.2.1 Metody rozrušení buněčné stěny kvasinek

Mechanické metody, v podobě užití různých mlýnků a homogenizátorů, jsou poměrně

jednoduché a použitelné v laboratorním měřítku i v průmyslu [4]. Po mechanické disrupci se do média uvolní kompletní vnitrobuněčný obsah, z nějž je pak nutné separovat požadovanou látku.

V laboratorním měřítku široce používané *enzymatické metody* mají výhodu vysoké selektivity, vykoupenu ovšem často velkou citlivostí na podmínky reakce a nákladností izolace/nákupu enzymu. Na rozrušení kvasničných BS jsou obvykle používány manázy, glukonázy, chitinázy a lytikáza/zymolyáza, které jsou, vzhledem ke složení BS červených kvasinek málo účinné. Nespecifita těchto enzymů vede jen k malému nebo prakticky žádnému rozrušení. Jako vhodný kandidát pro rozrušování BS červených kvasinek se jeví glukomanázy ve směsi enzymů izolované z kultury *Penicillium lilacinum*, u nichž byla prokázána vysoká schopnost štěpit tyto vysoce odolné BS [3; 5].

I při nalezení vhodného (tj. účinného a relativně levného) enzymu pro štěpení glukomananů bude enzymatická metoda stále doprovázena u enzymů poměrně běžnými problémy s reprodukovatelností, danými nestabilitou enzymového preparátu a proměnlivostí vzorků kvasinek, obzvláště ve výzkumu při kultivacích v různých podmínkách, s různým vlivem na stavbu BS. V průmyslovém měřítku již může být dosaženo validace metody i efektivní optimalizace prostřednictvím přesně určených podmínek (izolace enzymů a uchovávání, kultivace kvasinek i izolace produktů). Z hlediska optimalizace technologie bude důležitou úlohu hrát stáří kultury podstupující rozrušení (ať už enzymatické nebo mechanické), protože BS buněk ve stacionární fázi jsou mnohem odolnější. Bude tedy existovat tlak na co nejrychlejší produkci požadovaného metabolitu, aby poměr množství izolovaného a syntetizovaného produktu byl co nejvyšší a množství získaného produktu bylo v celkové bilanci ekonomicky výhodné.

2.2.3 Lipidická tělíska

Lipidická tělíska (lipid bodies, LB, též kapky – lipid droplets, LD) jsou v první řadě místem, kde je uložen zásobní zdroj uhlíku a energie v podobě triacylglycerolů a sterylerů mastných kyselin. Nejde ovšem o pasivní součást buňky, ale o organelu, jež neustále vyměňuje lipidy i další typy molekul se zbytkem buňky a sehrává tak důležitou úlohu v homeostáze nepochárných molekul.

Morfologické změny LB jsou ovlivněny procesy souvisejícími s metabolismem a homeostázou neutrálních lipidů a fosfolipidů [6]. Některé z červených kvasinek (např. *Rhodotorula*) mají ve svých buňkách velmi velké (tzv. „supersized“) LB, které mohou mít i více než 1 μm v průměru. Obdobně velké LB byl zkoumán u mutantu *S. cerevisiae* pomocí fluorescenční mikroskopie a koalescence dílčích malých LB byla nalezena jako mechanismus vzniku těchto útvarů [7]. Důležitou roli při tomto slévání lipidických tělísek zřejmě hrají vysoké intracelulární obsahy kyseliny fosfatidové a fosfatidylethanolaminu [7].

2.3 Karotenoidní kvasinky

Existují kvasinkové druhy, jejichž buňky v průběhu vývoje kultury akumulují karotenoidní pigmenty, typicky β -karoten, torulen a torularhodin. Tyto pigmenty produkují obzvláště v reakci na oxidační [8] a světelný stres [9] v prostředí a v důsledku přítomnosti těchto pigmentů jsou buněčné suspenze či kolonie zbarveny do růžova, červena či oranžova.

Karotenoidní kvasinky, pro své zbarvení označovány též jako červené kvasinky,

se taxonomicky řadí do třídy Basidiomycetes. Přirozeným prostředím pro mnohé z nich je povrch rostlin a jsou utilizátory mnohdy obtížně odbouratelných substrátů jako je xylóza, arabinóza a cukerné alkoholy, v omezené míře jsou některé druhy schopny rozkládat i taniny a lignin [10]. Schopnost rozkládat jinak obtížně využitelné odpady biologického původu z nich činí zajímavé organismy pro biotechnologické využití.

Mezi průmyslově využívané rody patří rody *Xanthophyllomonas* (*Phaffia*), *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*. Tyto i další rody jsou v současnosti teprve v rané fázi průmyslového využití, genetických manipulací i metabolického inženýrství [10]. Hlavními produkty jsou vedle pigmentů také aromata odvozená od některých primárních metabolitů. Vzhledem ke schopnosti některých druhů akumulovat lipidy do vysokého procentního obsahu v biomase pak tyto druhy mohou nalézt uplatnění jako zdroj tzv. „single cell oils“, obohacených o nenasycené MK, příp. jako krmivo obohacené o lipidy [11].

Kromě výše zmíněného vlivu oxidačního a světelného stresu má vliv na nadprodukcí karotenoidních pigmentů také složení media. Nadbytek karotenoidů tyto kvasinky tvoří v médiích chudých na dusík a bohatých na uhlík, limitace fosfátem může být také prospěšná, neboť fosfátové anionty inhibují syntézu fytoenu [12], prekursoru všech dalších karotenoidů.

2.3.1 Rod *Rhodotorula*

Kvasinky rodu *Rhodotorula* (nejznámějšími zástupci *R. mucilaginosa* a *R. glutinis*), které se po morfologické stránce vyznačují malými kulatými či oválnými buňkami, nezkrvají klasickým způsobem cukry, namísto toho využívají pentózový cyklus ke zpracování glukosy. Jejich výskyt je hojný po celém světě napříč různými prostředími a je dán schopností využívat široké spektrum substrátů a nízkými nároky na životní podmínky, především množství dostupného dusíku. Díky tomu jsou snadno kultivovatelné. V kapalných médiích bez dostatečného míchání sedimentují na dně kultivační nádoby. Vrstva usazených buněk je zbarvena v závislosti na celkovém množství karotenoidů a poměru jednotlivých druhů karotenoidů. Usazování souvisí s velikostí buněk a ta je spjata s vysokou schopností akumulovat lipidy, která vede k nárůstu velikosti buněk.

Nejhojněji zastoupený karotenoid u kvasinek tohoto rodu je torularhodin, pro který však doposud nebylo nalezeno vhodné uplatnění. Rhodotoruly jsou tak především zkoumány pro svou schopnost akumulovat lipidy bohaté na nenasycené mastné kyseliny a protože jsou schopny produkce určitých enzymů použitelných ve farmacii a v chemické syntéze (epoxidázy, oxidázy aminokyselin, amoniumlyázy a další) [10]. V rámci zkoumání možnosti využití odpadních substrátů se ukazuje, že některé druhy rhodotorul jsou schopny velmi dobře využít lignin obsahující substráty [13].



Obrázek 1: *Rhodotorula glutinis* na Petriho misce

2.3.2 Rod *Sporobolomyces*

Kvasinky rodu *Sporobolomyces* mají velmi dobrou schopnost produkce karotenoidů bez ohledu na typ kultivace. Jako mnoho ostatních červených kvasinek i *Sporobolomyces* se vyskytuje především ve fylosféře. Při kultivaci na pevné půdě vytvářejí ploché, drsné tmavě červené kolonie [14]. Samotné buňky bývají elipsoidní až protáhlé. Mezi nejčastěji zkoumané druhy patří *Sporobolomyces roseus*, v jehož případě jsou výhodou nízké nároky na dusík v médiu, jsou schopny využít i nitráty [14]. Do rodu patří i druhy *S. shibatanus*, *S. salmonicolor*, *S. pararoseus* a *S. metaroseus*.



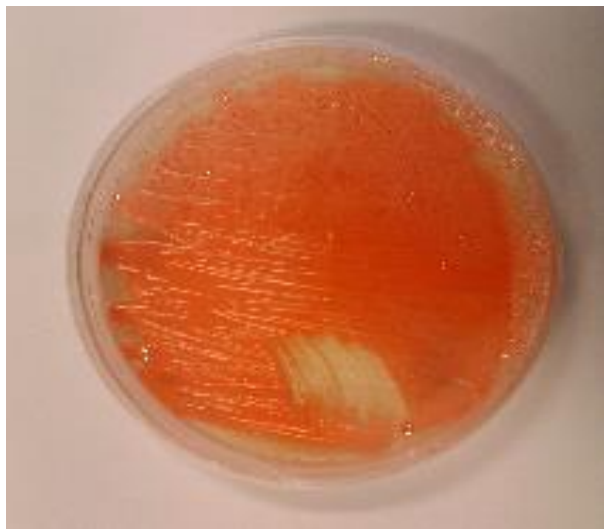
Obrázek 2: *Sporobolomyces shibatanus*

2.3.3 Rod *Phaffia*

Asi nejznámější karotenogenní kvasinkou je *Phaffia rhodozyma*, využívaná pro průmyslovou produkci astaxanthinu. Za vhodných podmínek produkuje velká množství karotenoidů a právě astaxanthin je majoritní komponentou karotenoidové směsi izolované

z *P. rhodozyma*. Karotenoidy obohacená biomasa se používá jako krmivo v chovech ryb (zlepšení vzhledu masa) a drůbeže (zlepšení vzhledu žloutků). *Phaffia* je schopná zkvašovat sacharidy [15], což ji odlišuje od ostatních rodů červených kvasinek.

2.3.4 Rod *Cystofilobasidium*



Obrázek 3: *Cystofilobasidium capitatum*

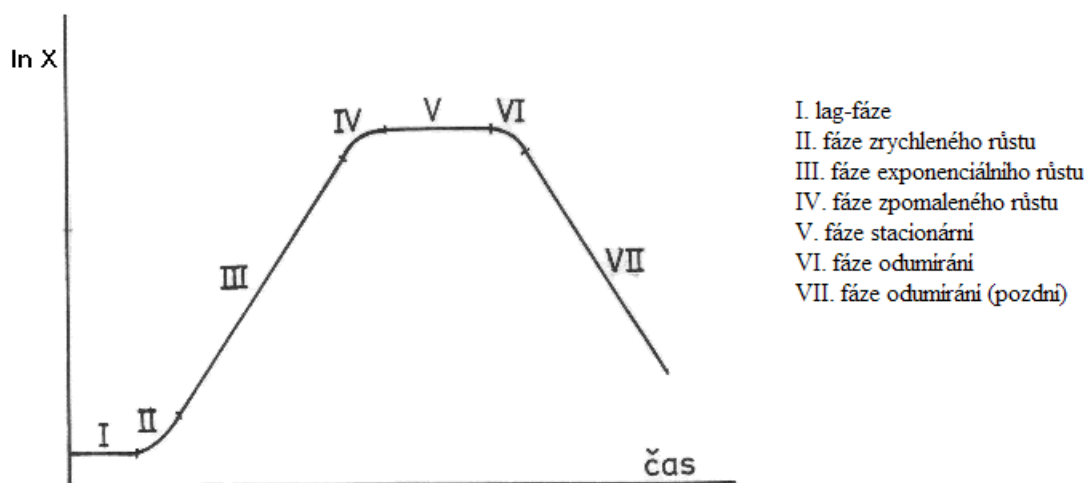
Kulaté až protáhlé buňky kvasinek rodu *Cystofilobasidium* tvoří při růstu na pevné půdě lesklé hladké kolonie s lehce červeným odstínem. V submerzní kultuře tvoří tenkou kožku a sediment. V této práci použitými zástupci tohoto rodu je *Cystofilobasidium capitatum*, který je schopen vytvářet jednojaderné mycelium, a *Cystofilobasidium macerans*. Dalšími zástupci je např. *C. infirmominiatum*. Zástupci rodu *Cystofilobasidium* jsou typičtí obsahem xylosy v buněčné stěně a schopností utilizovat glukuronát [1; 14].

2.4 Fáze růstu mikrobiální kultury

Růst kultur mikroorganismů ovlivňuje množství faktorů jako je pH, teplota, koncentrace látek nutných, prospěšných i škodlivých. Ať už v přirozeném prostředí nebo v laboratoři, mikroorganismy nemohou růst neomezeně, jsou limitovány množstvím faktorů.

Časový průběh vývoje kultury v tekutém mediu lze vystihnout množstvím buněk nebo – v případě organismů neakumulujících sekundární metabolity zvyšující výrazně biomasu – pomocí nárůstu biomasy v čase. Získaná křivka se nazývá růstovou křivkou a dělí se, v souladu s fyziologií růstu buněk, na několik úseků. V níže uvedeném grafu znázorňujícím schematicky růstovou křivku (Obrázek 4) je vidět, jak se jednotlivé fáze růstu odlišují co do rychlostí růstu kultury. Odlišnosti však dalece překračují pouhou rychlost růstu/úbytku biomasy – jsou dány charakterem metabolismu, který je dán podmínkami prostředí, ve které se buňka zrovna nachází.

Růstová křivka se tedy dělí na několik částí, jmenovitě 1) lag fázi, ve které se buňky, přenesené do kultivačního prostředí odjinud, přizpůsobují na podmínky nového kultivačního prostředí a posléze se začínají množit; 2) exponenciální fázi, která je typická rychlým množením obvykle malých buněk (malých ve smyslu komparace s možnými stavy buněk



Obrázek 4: Růstová křivka. Převzato z [85]

daného organismu), především je produkována biomasa a metabolity spjaté s růstem – primární metabolity; 3) stacionární fáze, kde jsou buňky větší, obvykle obsahují granule zásobních látek (dle druhu mikroorganismu) a produkují tzv. sekundární metabolity (karotenoidy, antibiotika,...); 4) fáze odumírání, kdy dochází k vyčerpání živin i zásobních látek a postupně dochází k úbytku životaschopných buněk, v závislosti na fyzikálních podmínkách a typu mikroorganismu trvá tato fáze měsíce až roky.

2.4.1 Lag fáze

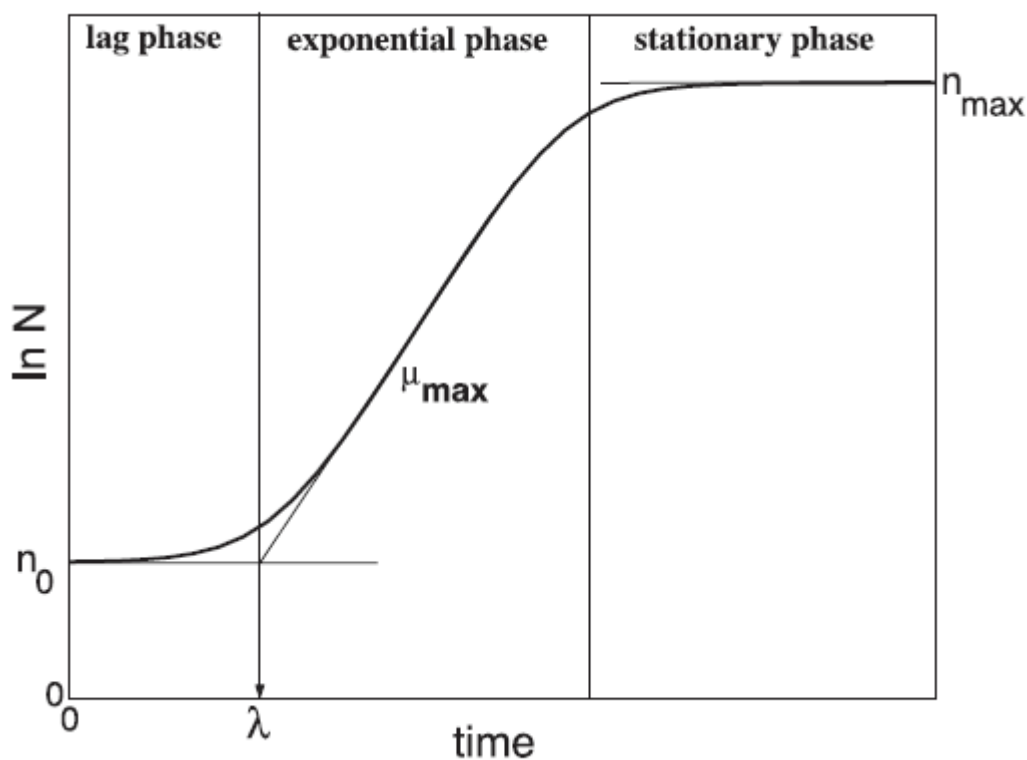
Lag fáze je specifickou částí života kultury, která může mít velký vliv na produkční schopnosti organismu v daném experimentu/šarži, bez ohledu na to, jestli jde o produkci biomasy, primárních metabolitů nebo sekundárních metabolitů. Z tohoto důvodu je žádoucí se jí v jistém nezbytném rozsahu zabývat. Lag fázi se rozumí období adaptace na změny prostředí, buďto po přenesení do čerstvého kultivačního média bohatého na živiny, nebo (méně často) se pod pojem lag-fáze zahrnuje také přizpůsobování se v průběhu probíhající kultivace, pak je hovořeno o tzv. intermediárním lagu. V dalším textu bude vždy uvažována počáteční lag fáze, nebude-li specifikováno jinak.

Proces přizpůsobování trvá obvykle desítky minut až několik hodin, v závislosti na organismu (prokaryota jsou rychlejší než eukaryota) a rozdílu podmínek mezi počátečním a cílovým prostředím. Dochází ke změnám v regulaci jednotlivých metabolických drah, které se mohou projevit změnami morfologickými (např. odbourávání granulí zásobních látek, zvětšení objemu buňky). Dochází k reorganizaci cytoskeletu, ať už v souvislosti s reakcí na osmotické změny v mikroprostředí [16] nebo v souvislosti se zahájením replikace na konci přizpůsobovacího procesu. Krátce po zaočkování inokula do nového prostředí je pozastavena biosyntéza všech proteinů, pro některé proteiny je to jen jakési pozastavení, pro jiné opravdu ustání biosyntézy [16; 17]. Po opětovném rozběhnutí biosyntézy proteinů pochopitelně dochází i k translaci proteinů v předchozím období neaktivních. Následně dochází k nárůstu množství proteinů v buňce [16; 17]. Závěr přizpůsobovacího procesu je doprovázen zmnožením buněčných struktur včetně replikace DNA, dochází k přípravě na první dělení v novém prostředí. Vhodnými technikami lze u kvasinek sledovat pohyb lipidických

transportních váčků do místa pučení [16].

Existují různé přístupy, jak z jednoduchého praktického hlediska definovat, měřit a porovnávat délku lag fáze za různých podmínek mezi různými organismy:

- 1) čas potřebný k zdvojnásobení počtu buněk/koncentrace buněk [18] – počet buněk se stanoví pomocí mikroskopického počítání, specializovaných čítačů buněk nebo průtokové cytometrie. V případě volby koncentrace buněk se obvykle používá OD – turbidimetrie.
- 2) Délka trvání přechodné periody, než dojde k dosažení maximální růstové rychlosti možné v daném prostředí [19]. Maximální rychlost množení je určena z růstové křivky, obvykle získané turbidimetrickým měřením.
- 3) Extrapolací tangenty k exponenciální části růstové křivky na úroveň inokula (Obrázek 5) – nejrozšířenější, ale jsou nutné přibližně konstantní podmínky prostředí, jsou-li v čase proměnlivé, může být přechod lag fáze – exponenciální fáze hůře rozlišitelný.



Obrázek 5: Určování délky trvání lag fáze – extrapolace tangenty k exponenciální části růstové křivky. Převzato z [20]

Hlavní aspekty ovlivňující délku lag fáze souvisejí se změnou fyzikálních a chemických podmínek prostředí, ve kterém se organismy vyskytují. Lépe řečeno, jde o velikost změny (ΔZ) a její rychlost (dZ/dt) [20]. Pochopitelně závisí na organismu a na fenotypu, který vykazoval před uvedením do nového prostředí. S tím souvisí fáze růstu a fyziologická historie inokulační kultury. Obvykle se udává následující pořadí růstových schopností buněk: exponenciálně rostoucí buňky > stacionární fáze \approx hladovějící > zmražené buňky >> lyofilizované. U hladovějících buněk se s délkou hladovění prodlužuje lag fáze, obzvláště významný je tento efekt při použití malého inokula (př. inokulačního poměru) [20].

Co se týče velikosti inokula/inokulačního poměru, je zásadní role pravděpodobnosti přítomnosti dostatečného počtu buněk s krátkým individuálním tzv. „lag-časem“ („lag time“), která je v malé (relativně malé) buněčné populaci nízká. Efekt velikosti inokula je výraznější poblíž rozhraní podmínek růst/žádný růst, tedy v případech, kdy se zdaleka ne všechny buňky (bez ohledu na velikost lag-času) dovedou přizpůsobit málo vhodným podmínkám [20]. Na úrovni individuálních buněk se pak efekt nepříznivých podmínek projevuje růstem středních hodnot lag-času pro danou populaci a distribuce lag-časů se stává širší, tedy existuje mnohem vyšší variabilita napříč zkoumanou populací [20; 21].

Zvláštním případem vlivu je pak „kvalita“ inokula – v zásadě nedefinovaná veličina, nepříliš prozkoumaná, s pravděpodobně odlišnými parametry pro posouzení při různých biotechnologických výrobcích.

Obzvláštní komplikací problematiky lag fáze je, že kombinovaný vliv jednotlivých faktorů není aditivní.

2.5 Karotenoidy

Karotenoidy jsou nenasycené alifatické a alicyklické uhlovodíky (karoteny) a jejich oxidační produkty (xanthofyly), řadí se mezi isoprenoidy ze skupiny tetraterpenů (C₄₀ uhlíkatá kostra). Polyenová struktura předurčuje silnou absorpci v modré a zelené oblasti spektra, s následkem žlutého až červeného zbarvení. Dvojně vazby mají většinou konformaci *all-trans*, karotenoidy mohou mít strukturu plně lineární nebo s jedním či dvěma cykly v koncových částech molekul. Jedná se o lipofilní barviva, která se v buňkách distribuují do membrán, kde chrání lipidy před peroxidací. Mají antioxidační vlastnosti [22], díky přítomnosti dvojných vazeb, které jsou citlivé k epoxidaci a oxidaci. Zároveň jsou náchylné k fotodegradaci [23] a jsou schopné vychytávat radikály a neutralizovat reaktivní formy kyslíku a dusíku [24].

Mikrobiální a rostlinné buňky produkují karotenoidy jako sekundární metabolit. Slouží k ochraně před oxidačním stresem a při nadměrném osvětlení, ale také se účastní fotosyntézy a to jako pomocné barvivo při přenosu energie v anténových komplexech chlorofylů. Pro člověka neopomenutelný význam těchto molekul tkví v účasti na procesu vidění (provitamin A - retinol/retinal) a při prevenci civilizačních onemocnění.

2.5.1 Biosyntéza karotenoidů

Biosyntetická dráha karotenoidů vychází z izoprenoidové dráhy. Výchozí látkou je acetylkoenzym A, který kondenzuje s acetoacetyl-CoA (vzniklý kondenzací dvou AcCoA) za vzniku β -hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA); ten je redukován na mevalonát (MVA). Následně je MVA přeměněn přes isopentenylidifosfát a jeho isomer dimethylallyldifosfát na geranyldifosfát kondenzací isopentenylidifosfátu a dimethylallyldifosfátu způsobem hlava-pata. Po vzniku geranylgeranyldifosfátu (GGPP) dalšími kondenzačními reakcemi dojde ke kondenzaci 2 molekul GGPP na fytoen. Tento bezbarvý meziprodukt je výchozí látkou pro syntézu karotenoidů. Několikanásobnou desaturací fytoenu vzniká lykopen, dalšími úpravami pak např. lutein nebo β -karoten (z něj pak např. zeaxanthin, violaxanthin...).

2.5.2 Současná a budoucí použití karotenoidů

Jedním z již tradičních použití karotenoidů je obarvování potravin (E160, E161), velmi často obarvování margarínů a sýrů. Nejběžnější býval syntetický β -karoten, jehož výroba je v současnosti stále levnější než biotechnologická produkce, ovšem použití syntetických karotenoidů v potravinách začalo být regulováno a proto se hledají cesty, jak zefektivnit biotechnologickou produkci karotenoidů. Jednou z nevýhod biotechnologických karotenoidových produktů je směsná povaha s proměnlivým zastoupením jednotlivých karotenoidů [25].

Kromě využití jako potravinářská barviva se karotenoidy používají jako výživové doplňky (důraz na antioxidační schopnosti karotenoidů), na základě provedených studií a úvah beroucích v potaz vlastnosti těchto molekul se předpokládá preventivní vliv u onemocnění rakovinou [26] a u srdečně-cévních onemocnění. Zároveň však existuje studie poukazující na možné kontraindikace – u kuřáků je vliv dodaných karotenoidů negativní, tj. pravděpodobně indukující rakovinné bujení [27]. U karotenoidů lze také předpokládat hypolipidemický efekt [28].

Karotenoidy, především poměrně snadno dostupný astaxanthin, nacházejí užití v krmivech pro lososy a drůbež. Suplementace krmných směsí karotenoidy vede ke zlepšení barvy masa i vaječných žloutků.

Karotenoidy mají potenciál být jedním z adeptů na molekuly budoucnosti. Kromě výše zmíněného průmyslového uplatnění a uplatnění v péči o zdraví mohou dojít širokého spektra aplikací v elektronice, včetně organické, biodegradabilní a konzumovatelné (tzv. „edible“) elektroniky. Jednou z možností je výroba organických biodegradabilních fotočlánků [29; 30]. V současnosti zkoumané systémy karotenoidů (fukoxanthin, β -karoten, lykopen) s elektronakceptorně derivatizovanými fullereny se zatím potýkají s obtížemi [31]. Další, poměrně neobvyklou možností aplikace karotenoidů v elektronice je příprava molekulárních vodičů pro kvantové počítače [32; 33].

Ať už bude použití karotenoidů jakékoliv, je nutné je vyprodukovat v dostatečném množství a čistotě. Biotechnologická produkce karotenoidů je v popředí zájmu z několika důvodů. Důležitým aspektem je větší zájem spotřebitelů o přírodní produkty, produkty přírodního původu společně s obavou o bezpečnost potravin. Kompetitivní biotechnologické produkci nahrává nízká cena surovin při využití odpadních substrátů, malá plocha zabraná výrobními linkami v porovnání s potřebnou plochou pro pěstování plodin, které by sloužil jako suroviny pro extrakci karotenoidů, a také to, že biotechnologická produkce není ovlivňována počasím, podnebnými podmínkami, složením půdy a dalšími environmentálními aspekty, které se projevují při pěstování plodin.

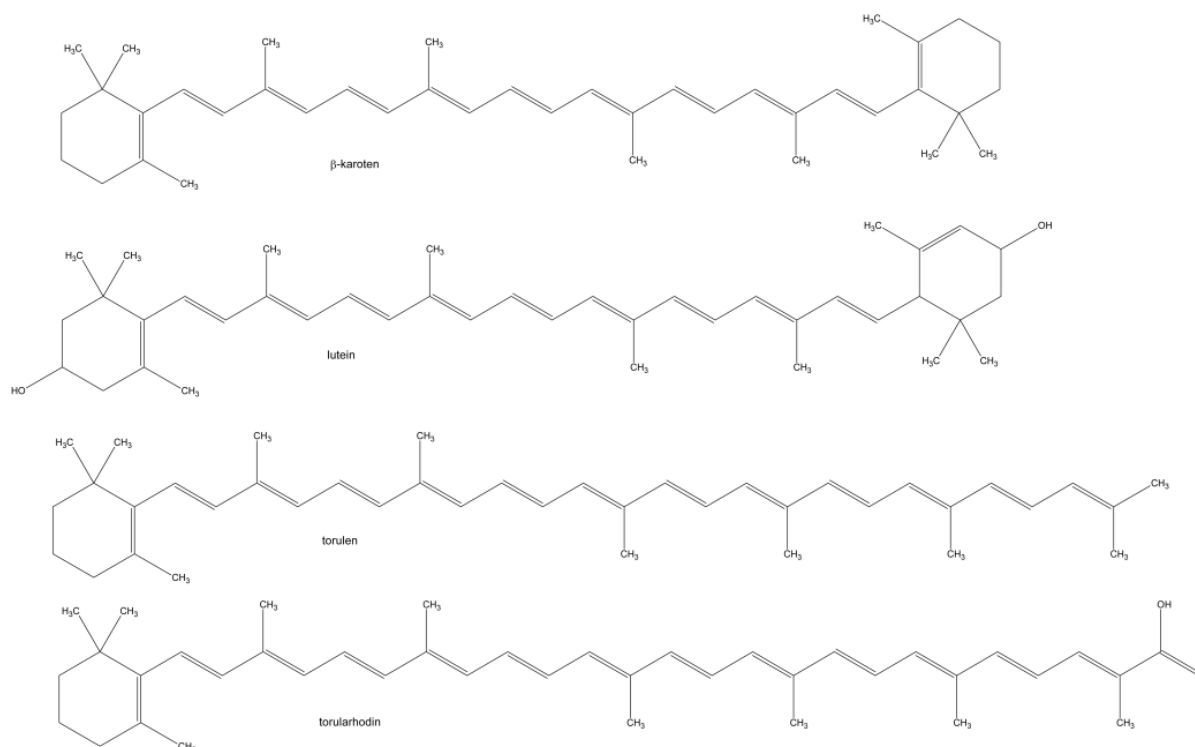
2.5.3 Přehled nejvíce zkoumaných karotenoidů

β -karoten

Pravděpodobně v potravě nejhojněji zastoupený karotenoid je termolabilním červeno-oranžovým pigmentem, který je nejčastěji ze všech karotenoidů spojován s ochranou proti srdečně-cévním onemocněním a rakovinou [34; 35]. Hlavní účast na mechanismech vzniku atherosklerózy spočívá v inhibici oxidace lipoproteinů [34].

Co se zhojného bujení týče, konzumace zeleniny bohaté na β -karoten více než jednou

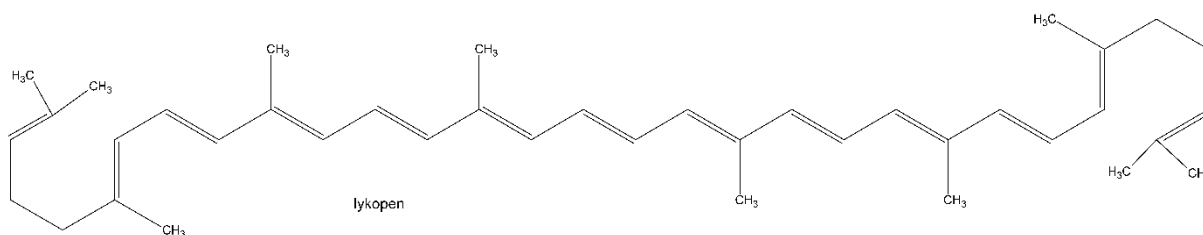
týdně má prokázané pozitivní účinky v prevenci rakoviny plic [26].



Obrázek 6: Nejčastěji zastoupené karotenoidy v kvasinkách

Lykopen

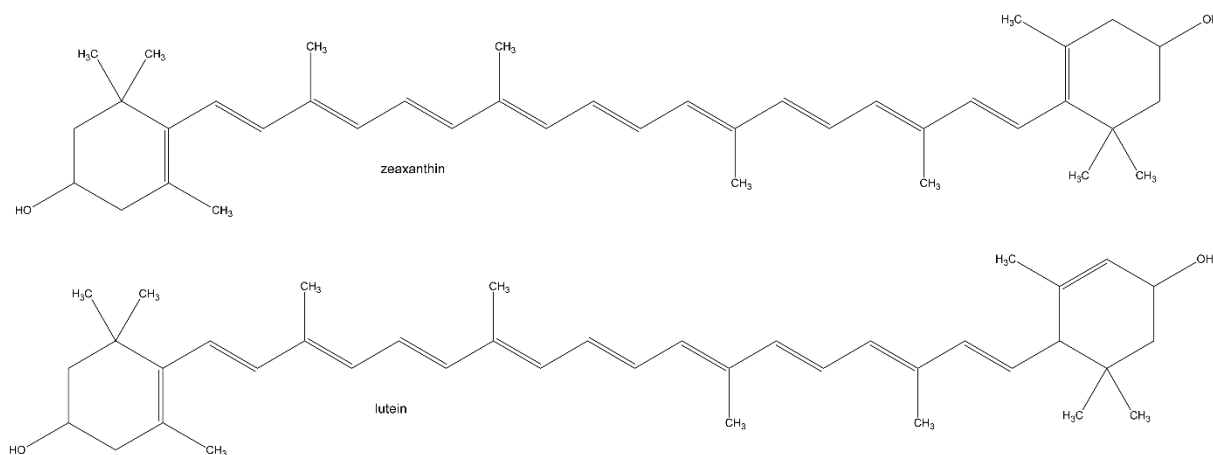
Lykopen se řadí mezi nepolární karotenoidy. Jeho chemická struktura symetrické molekuly s 11 konjugovanými dvojnými vazbami z něj činí jeden z nejlepších biologických zhášeců radikálů, oproti β-karotenu s přibližně dvojnásobnou antioxidační aktivitou [36; 37]. Klinické a epidemiologické studie ukazují na pozitivní vliv stravy bohaté na lykopen projevující se ve sníženém riziku onemocnění rakovinou vaječníků a plic, stejně jako menší incidence degenerativních a srdečně-cévních onemocnění [38; 39].



Obrázek 7: Struktura lykopenu

Lutein a zeaxanthin

Tyto xanthofyly jsou velmi blízké lidskému tělu, jsou zásobní formou karotenoidů, která je uskladňována v sítnici. Jejich vysoký příjem ve stravě (špenát, brokolice, vejce) je považován za preventivní faktor proti rozvoji katarakty a makulární degenerace [40].

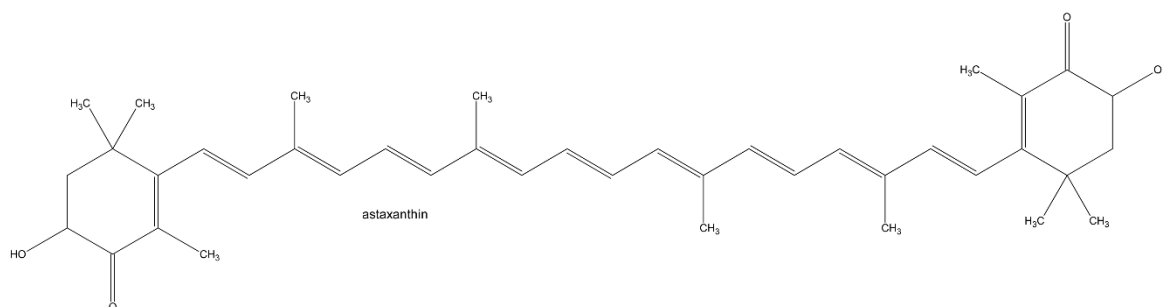


Obrázek 8: Zeaxanthin a lutein – rozdíl v jejich strukturách

Astaxanthin

Astaxanthin je xanthofyl, který dává typické zabarvení mořským korýšům žijícím se fytoplanktonem, jako jsou krevety a humři. Tento pigment tedy je korýši přijímán ve stravě, není žádnými živočichy syntetizován. V krmivářském průmyslu se dočkal uplatnění, používá se jako přísada do krmných směsí ryb (typicky lososů) a drůbeže [41].

Antioxidační aktivita astaxanthinu je přibližně 10x větší než v případě β -karotenu [42]. Vztahují se na něj prakticky všechny již zmiňované medicínsky významné vlastnosti karotenoidů týkající se prevence civilizačních onemocnění.



Obrázek 9: Struktura molekuly astaxanthinu

2.6 Lipidy

Jedním z trendů biotechnologického výzkumu posledních let je zkoumání možnosti produkce mikrobiálních lipidů – tzv. single cell oils – obohacených o polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), tedy medicínsky a výživově důležité látky jako je kyselina linolová, linolenová a eikosapentaenová [43]. Zvláštním lákadlem je pak využití levných odpadních substrátů potravinářského průmyslu a zemědělství [44] pro výrobu těchto látek, a to vzhledem k obecně širokému spektru mikroorganismy utilizovatelných substrátů v kombinaci s relativně vysokým podílem akumulovaných lipidů v biomase oleogenních organismů.

Lipidy patří mezi základní stavební kameny života. V mikroorganismech i člověku tvoří systémy biomembrán, na jejichž površích se odehrávají klíčové děje pro udržení a proliferaci života, jsou zásobami energie, signálními molekulami i tepelnou izolací. Jedno z možných rozdělení je do dvou skupin [45]: 1) jednoduché lipidy, kam patří acylglyceroly a vosky; a 2) složené lipidy, na které lze nahlížet jako na substituované acylglyceroly, kde jedna

z esterových vazeb je použita k vazbě jiné molekuly než mastné kyseliny. Obvykle mají amfifilní vlastnosti – např. fosfolipidy a glykolipidy.

2.6.1 Biosyntéza lipidů a mastných kyselin

Výchozí molekulou pro syntézu MK, probíhající v cytosolu buněk, je AcCoA. Ten musí být do cytosolu transportován z mitochondrií při nadbytku ATP pomocí trikarboxylátového transportního cyklu. Nadbytečný pyruvát je namísto dekarboxylace a převedení na AcCoA naopak karboxylován (za spotřeby ATP) na oxalacetát, který je běžnými reakcemi citrátového cyklu (kondenzací s AcCoA) převeden na citrát, jenž je trikarboxylátovým přenašečem transportován do cytosolu. Zde je pomocí citrátlyázy AcCoA uvolněn, vzniklý oxalacetát je přes malát redukován a dekarboxylován na pyruvát [46].

AcCoA je v cytosolu navázán na ACP a posléze na enzymatický komplex syntázy MK (fatty acid synthase, FAS) za uvolnění ACP. Jiná molekula AcCoA je působením karboxylázy převedena na malonyl-CoA, který je navázán na ACP, který jej předává na FAS, kde jsou tyto dvě větve cytosolického zpracování AcCoA propojeny kondenzací a dekarboxylací na acetoacetyl-ACP. Další úpravy (redukce) acetoacetyllového zbytku připomínají obrácenou β -oxidaci. Opakováním připojování dvouuhlíkatých zbytků nakonec vzniká palmitoyl-ACP, který je posléze z komplexu odštěpen za vzniku volné palmitové kyseliny. Dalšími enzymatickými úpravami z ní vznikají další MK.

Syntéza triacylglycerolů pak je esterifikací glycerol-3-fosfátu mastnou kyselinou na lysofosfatidát, další esterifikací vzniká fosfatidát a nakonec triacylglycerol [45].

2.7 Fluorescence

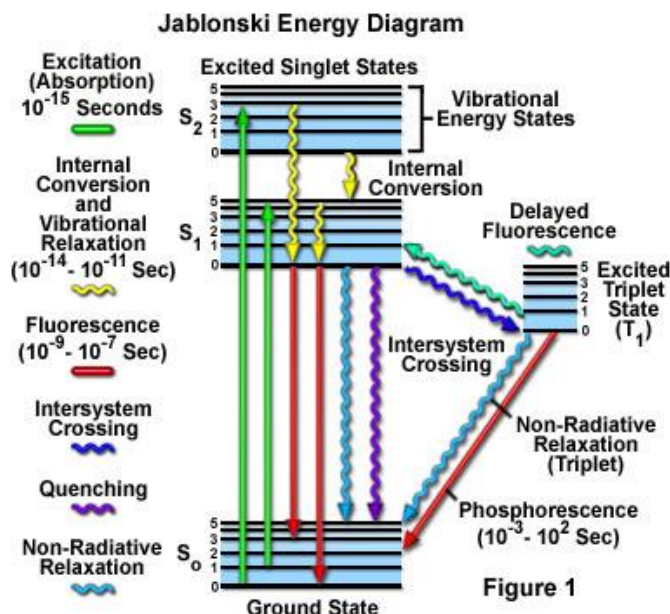
Fluorescence je formou luminiscence, kdy molekula přechází do excitovaného stavu působením elektromagnetického záření – interakcí s fotony. Samotná luminiscence jako obecný pojem je definována jako záření vznikající samovolně v důsledku nadbytečné energie, která je vyšší než odpovídá tepelným pohybům v dané látce. Dochází tak k emisi záření z elektronově excitovaných stavů, které mohly vzniknout různými cestami (mechanicky – triboluminiscence, působením záření – fotoluminiscence, chemickou reakcí – chemoluminiscence). V případě fotoluminiscence se dle elektronové konfigurace excitovaného stavu vyčleňuje fluorescence (singletový excitovaný stav) a fosforescence (tripletový excitovaný stav).

2.7.1 Fosforescence

Excitovaný stav je v případě fosforescence tripletový, tedy elektron vybuzený na vyšší energetickou hladinu má shodně orientovaný spin jako k němu párový elektron, který zůstal ve svém základním stavu. Při excitaci tedy došlo k velmi nepravděpodobné změně spinu elektronu („zakázaný přechod“), a stejně tak i při deexcitaci musí dojít ke změně spinu. To ústí v řádově delší setrvání molekuly v excitovaném stavu, prodlužuje se tzv. doba života excitovaného stavu. Zatímco u fluorescence je obvyklá doba života v řádu jednotek až desítek nanosekund, u fosforescence jsou běžné doby života mikrosekundové i delší. Dalším rozdílem mezi fluorescencí a fosforescencí je vlnová délka emise – vzhledem k menšímu energetickému rozdílu mezi hladinami $T_1 \rightarrow S_0$ než v případě fluorescenčního přechodu $S_1 \rightarrow S_0$ je vlnová délka fosforescence větší než v případě fluorescence dané molekuly (Obrázek

10).

2.7.2 Fluorescence



Obrázek 10: Energetické přechody vyjádřené Jablonského diagramem [86]

Je-li excitovaný stav po absorpci fotonu singletový, tak v případě záření emitovaného při deexcitaci hovoříme o fluorescenci. Vyzářený foton má menší energii než foton dopadajícího záření v důsledku nezářivých relaxačních přechodů – viz Jablonského diagram (Obrázek 10).

Na Jablonského diagramu lze názorně ilustrovat děje – přechody – ke kterým dochází při fluorescenci. Absorpcí fotonu je elektron převeden na vyšší energetickou hladinu, ze základního singletového stavu S_0 do excitovaného singletového stavu S_1 . Poté vlivem vibračních relaxací excitované molekuly (energie je vyzářena v IČ oblasti) dojde k přechodu na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu S_1 . Poté za emise fotonu (fluorescence) je elektron deexcitován na některou z vibračních hladin základního stavu S_0 , kde dalšími vibračními přechody dojde k relaxaci až na hladinu s nejnižší energií.

Na výše uvedeném obrázku (Obrázek 10) je naznačen jev nazvaný zpožděná fluorescence, který nastává tehdy, když elektronu v tripletovém stavu je během čekání na deexcitační přechod dodána energie nutná přesunu do singletového stavu S_1 odkud poté proběhne (rychlá) zářivá deexcitace. Výsledkem tohoto jevu je záření, které svou vlnovou délkou odpovídá fluorescenci, nicméně dobou života je srovnatelné s fosforescencí.

Výše zmiňované nezářivé vibrační přechody způsobují posun vlnové délky emisního záření oproti záření excitačnímu. Dochází ke snížení energie, tedy zvýšení vlnové délky (bathochromní posun), tato změna je charakterizována rozdílem maxim excitačního a emisního spektra a nazývá se Stokesův posun. Co se týče samotných absorpčních a emisních spekter, tak ta v případě jednodušších organických molekul většinou vykazují zrcadlovou symetrii. Ta je dána kvantově-mechanicky, kdy relativní pravděpodobnost absorpce a relativní pravděpodobnost emise ze sobě odpovídajících si energetických hladin jsou shodné [47].

2.7.3 Autofluorescence

Autofluorescence je jev, kdy v buňkách živých organismů je pozorována samovolná fluorescence, tedy aniž by došlo k přidavku jakéhokoliv fluoroforu. Je způsobena molekulami schopnými vykazovat fluorescenci, molekulami, které se přirozeně v buňce nacházejí. K vybuzení fluorescence pak v zásadě postačuje jen záření o vhodné vlnové délce. Hlavními molekulami zodpovědnými za autofluorescenci patří flaviny a NADH [48; 49], tedy ubikvitní molekuly, které nalezneme ve všech organismech. Zvláštním případem jsou proteiny vykazující fluorescenci, nejznámějším je zeleně fluoreskující protein („green fluorescence protein“, GFP), který je využíván v molekulární biologii při studiu míry exprese genů. GFP se také stal předmětem genetického inženýrství, vznikly jeho žluté a červené varianty, které umožňují porovnávat expresi více genů, resp. operonů.

Ve zmiňovaných pracích [48; 49] byly zkoumány vlastnosti fluorescence vydávané savčími buňkami. Výsledky daných výzkumů ukázaly na dvě specíe, z porovnání naměřených spekter se známými spektry bylo určeno, že podstatná část buněčné fluorescence je způsobena nikotinamidadenin dinukleotidem (NADH) a flavinovými koenzymy. Předpokládá se, že intenzita autofluorescence v daných vlnových délkách odráží vnitrobuněčnou koncentraci diskutovaných sloučenin.

NADH a flaviny jsou excitovatelné mnoha vlnovými délkami, a to včetně modré části spektra, která je ve fluorescenční mikroskopii a cytometrii používána nejčastěji (v podobě laserů 467 a 488 nm). Také emisní spektra NADH a flavinů jsou rozepjata přes rozsáhlou část viditelného spektra (500-700 nm) a překrývají se tak s emisními spektry běžných fluorescenčních sond. Tento překryv více či méně ruší při analýzách využívajících fluorescenční sondy. Doby života koenzymů se pohybují v rozmezí 0,5-0,8 ns, přičemž oxidované formy mají delší doby života než redukované [50; 51]. Koenzymy ovšem často vykazují vícerozpádovou kinetiku a mohou tak mít i delší dobu života v řádu jednotek nanosekund [50; 51].

Autofluorescence ovšem nemusí být nutně špatná, naopak lze ji využít při stanovení metabolitů, které mají schopnost fluorescence. V buňkách červených kvasinek takto fluoreskují karotenoidy, které absorbují modré světlo (440-500 nm) a emitují v zelené oblasti spektra (cca 500-550 nm). Kvantový výtěžek fluorescence je ovšem u karotenoidů velmi nízký, pro β -karoten činí $1,7 \cdot 10^{-4}$ [52]. To znamená, že jen velmi málo dopadajících fotonů má svůj protějšek v emisi fotonu, většinou se předaná energie „ztratí“ do okolního prostředí pomocí nezářivých přechodů. Pro srovnání – běžné kvantové výtěžky fosforescence (symetricky zakázaného jevu z hlediska kvantové mechaniky) se pohybují v řádu 10^{-6} [47].

2.7.4 Časově rozlišená fluorescence a kvantové výtěžky

Doba života fluorescence a kvantový výtěžek jsou zřejmě těmi nejdůležitějšími charakteristikami fluoroforu. Kvantový výtěžek je podíl počtu fotonů emitovaných k počtu fotonu absorbovaných. Doba života určuje čas, který má excitovaný fluorofor k dispozici pro interakce s prostředím a pro difúzi napříč prostředím. Určuje tak i informace, které se z emisních charakteristik daného fluoroforu dají získat [47].

Kvantový výtěžek Q lze popsat rovnicí

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

kde Γ je rychlostní konstanta zářivého (fluorescenčního) rozpadu excitovaného stavu, k_{nr} je součet rychlostních konstant všech možných nezářivých (non-radiative) přechodů, součet těchto dvou parametrů je pak celkovou rychlostní konstantou rozpadu daného excitovaného stavu. Kvantový výtěžek je blízký jedné v případě, že $k_{nr} \ll \Gamma$, vzhledem ke Stokesovským ztrátám je vždy menší než jedna.

Doba života τ excitovaného stavu je definována jako průměrný čas, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem na základní hladinu. Lze jej zapsat jako:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

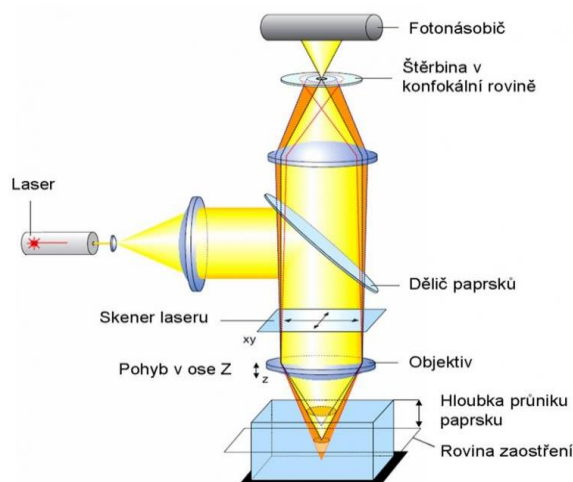
Emise fluorescence je náhodný proces, což znamená mimo jiné také to, že jen málo molekul emituje přesně v čase $t = \tau$. Doba života je jakousi průměrnou hodnotou času stráveného v excitovaném stavu. V případě jednoduchého exponenciálního rozpadu 63 % molekul se rozpadne před okamžikem $t = \tau$ a zbývajících 37 % se rozpadne poté.

Jak kvantový výtěžek, tak dobu života lze ovlivnit faktory s vlivem jak na Γ , tak na k_{nr} . Těmito vlivy mohou být jak substituenty v molekule, pH prostředí, jeho polarita, specifické interakce s jinou molekulou v prostředí, viskozita nebo teplota [47].

Jednou z vlastností fluorescence je nezávislost pozorovaného emisního spektra na excitační vlnové délce [53]. Kvantové výtěžky jsou nezávislé na vlnové délce [47]. Excitace (kratšími vlnovými délkami) do vyšších elektronových a vibračních hladin je provázena rychlou relaxací (10^{-12} s) na nejnižší vibrační hladinu S1, odkud poté dochází k zářivému přechodu zpět do základního stavu. Čili co se zářivých přechodů týče, dochází k nim mezi stejnými hladinami, což ústí ve stejná emisní spektra daného fluoroforu při různých excitačních vlnových délkách.

2.7.5 Fluorescenční mikroskopie zobrazování dob života

Fluorescenční mikroskopie zobrazování dob života (Fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM) je variantou laserové rastrovací konfokální mikroskopie, která využívá citlivou detekční elektroniku, schopnou zaznamenat čas dopadu fotonu na detektor s vysokým časovým rozlišením (až v řádu jednotek pikosekund). Nástup konfokální mikroskopie umožnil vyšší dosažitelné rozlišení, a to díky jedinečnému principu využívajícímu clonku s bodovým otvorem („pinhole“) o rozměru v řádu desítek mikrometrů. Na detektor dopadá pouze světlo, které prošlo otvorem, což znamená omezení dopadajících paprsků na paprsky původem z úzké fokální roviny. Paprsky z mimo-ohniskových rovin jsou zadrženy clonkou (Obrázek 11). Skenováním vzorku odchylováním laserového paprsku nebo pohybem objektivu lze tak získat informace, které po softwarovém zpracování mohou dát i trojrozměrné zobrazení vzorku. Výhodou laseru jakožto excitačního zdroje je schopnost zajištění dostatečné excitace i pro fluorofory s nízkým kvantovým výtěžkem, mezi něž patří i (v této práci zkoumané) karotenoidy.



Obrázek 11: Princip konfokální mikroskopie [54]

Pro získání dob života fluorescence je vyhodnocována závislost intenzity fluorescence v čase

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}$$

Rovnice vystihuje exponenciální rozpad excitovaného stavu. Závislost je experimentálně získána postupným sčítáním fotonů dopadajících na detektor (v čase rozlišené sčítání fotonů, „time correlated single photon counting“, TCSPC) v různých časových intervalech mezi dvěma záblesky laseru (je tedy použita pulzní excitace). Tato závislost je označována jako vyhasínací křivka.

Doba života fluoroforu souvisí s rychlostními konstantami jednotlivých deexcitačních procesů k_i vztahem

$$\frac{1}{\tau} = \sum_i k_i.$$

Doba života fluoroforu je zcela nezávislá na intenzitě excitačního záření. Je-li citlivost detektorů dostačující, pak zkoumání dob života umožňuje spolehlivé rozlišení fluoroforů emitujících při stejné vlnové délce. Výše zmíněnou nezbytnou podmínkou měření doby života je použití pulzního laserového zdroje – po excitačním pulzu se měří odezva detektoru v čase, přičemž pro tato TCSPC měření je typické, že dopadne méně než jen jeden foton na detektor za excitační cyklus, který se proto opakuje tak dlouho, než je získáno potřebné množství dat (dopadlých fotonů) pro výpočet doby života z naměřené vyhasínací křivky. Čím více fotonů je detekováno v průběhu měření, tím vyšší kvalitu má vyhasínací křivka. Pro statisticky správné vyhodnocení se udává potřeba alespoň 4 000 fotonů [47]. Čím více fotonů dopadne na detektor v jednom excitačním cyklu, tím hůře pro přesnost měření, protože proudové pulzy způsobené dopadajícími fotony se mohou slévat.

Fluorescenční sondy, které jsou svými vlastnostmi citlivé na prostředí, ve kterém se nacházejí (vliv solvatace, pH, přítomnosti iontů aj.), lze pomocí časově rozlišené fluorescence výborně zkoumat, s jejich použitím lze ve vzorku rozlišovat (lokalizovat) jednotlivé oblasti s odlišnými vlastnostmi.

Chceme-li lokalizovat karotenoidy v buňce, pak je klíčovým parametrem znalost jejich doby života stejně jako znalost doby života dalších ve stejné spektrální oblasti fluoreskujících buněčných komponent. Pro β -karoten lze v literatuře dohledat hodnotu $8,4 \pm 0,6$ ps [55], a to pro případ volně v roztoku se vyskytujících molekul (náhodná orientace molekul, žádné významnější stabilizační efekty).

2.8 Metody studia buněk a buněčných metabolitů

2.8.1 Turbidimetrické stanovení sušiny (absorpční spektrofotometrie)

Aby bylo možné vztáhnout produkci karotenoidů či lipidů na jednotku hmotnosti buněk, je nezbytné stanovit sušinu. Jednou z možností je turbidimetrické stanovení, kdy – obvykle s pomocí spektrofotometru nebo specializovaného turbidimetru – je stanoveno množství buňkami rozptýleného světla. Pro takové stanovení je nutné zvolit vlnovou délku, která není buňkami absorbována, aby nedocházelo ke zkreslení. Obvykle se využívá vlnových délek v červené oblasti spektra. V případě červených kvasinek je obvykle užívána vlnová délka 640 nm [56]. Turbidimetrie je rychlou metodou, vyžaduje ovšem kalibraci, nejlépe prováděnou s ohledem na gravimetrické stanovení. Pro dostatečnou přesnost měření se doporučuje ředit buněčné suspenze tak, aby měřena absorbance byla v rozmezí 0,2 - 0,6 a.u. Běžná praxe používání turbidimetrických sond ve fermentorech poskytuje v zásadě jen orientační stanovení sušiny – zda roste nebo klesá a jaké je tempo těchto změn.

2.8.2 Gravimetrické stanovení sušiny

Základní, byť zdlouhavější variantou pro stanovení sušiny je gravimetrické stanovení, kdy centrifugované buňky promyté od solí a dalších komponent media se vysuší v horkovzdušné sušárně nebo pod infralampou, a to až do konstantní hmotnosti. K sušení musí docházet při takových teplotách, kdy nedochází k tepelné degradaci komponent biomasy s následným únikem vzniklých volatilních sloučenin. Obvyklé je užití teplot v rozmezí 70-90 °C.

2.8.3 Průtoková cytometrie

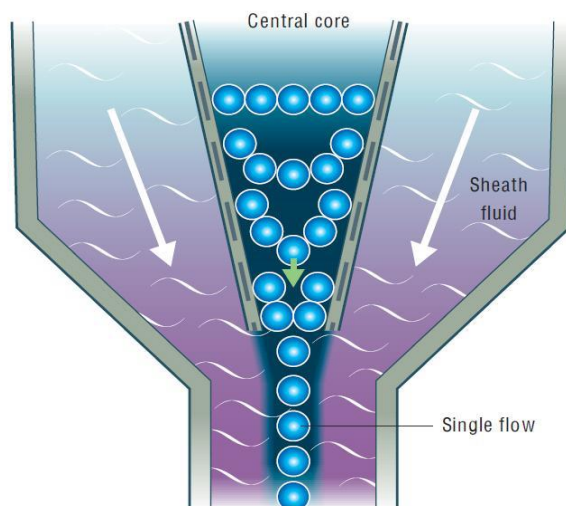
Průtoková cytometrie se řadí mezi moderní pokročilé metody analýzy buněčných populací. Je typická multiparametrickými měřeními a zkoumáním vlastností populace buněk prostřednictvím zkoumání jednotlivých buněk (tzv. analýza na úrovni jedné buňky, „single cell analysis“). Velkého uplatnění se dočkala v klinických oborech, v posledních letech jsou zkoumány její možnosti v mikrobiologii (příklady v kap. 2.8.4).

Princip průtokové cytometrie je následující: pomocí jevu hydrodynamické fokusace [57] dochází k vytvoření úzkého svazku kapaliny (suspenze vzorku), který unáší jednotlivé od sebe oddělené buňky a prochází paprskem laseru. Při setkání buněk s laserovým paprskem dochází k dvěma zaznamenávaným jevům – rozptylu světla a excitaci v buňce přítomných fluoroforů. Rozptýlené světlo i fluorescence jsou detekovány pomocí fotonásobičů nebo diod (to jen v případě rozptylu), vzniklý signál je zpracován a uložen počítačem. Buňky jsou poté posílány buďto do odpadní nádoby, nebo dochází k jejich sběru a třídění pro následné analýzy (např. Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS®).

Rozptýlené světlo je zaznamenáváno ve formě dvou parametrů. Prvním je přímý rozptyl (tzv. „forward scatter“ - FSC), který je měřen v malé úhlové odchylce vůči přímému směru laserových paprsků a jehož hodnota je závislá velikosti buněk. Boční rozptyl (tzv. „side

scatter“ – SSC), je obvykle měřen v pravém úhlu ke směru laserových paprsků a je úměrný vnitřní členitosti buněk (množství organel, inkluzí, zásobních tělísek...). Fluorescence je také detekována v pravém úhlu, a to soustavou fotonásobičů. Výběr vlnové délky je dán volbou příslušných filtrů.

Při analýze se používají různé fluorescenční sondy buď samostatně, nebo v konjugaci s protilátkami. Sondy se váží nekovalentně ke zkoumané látce v buňce nebo na buněčném povrchu, přitom nastává taková interakce elektronů, při které je zvýšena schopnost dané molekulární struktury fluoreskovat nebo dochází k posunu emisní vlnové délky.



Obrázek 12: Princip hydrodynamické fokusace [57]

2.8.4 Stávající využití průtokové cytometrie při studiu kvasinek

Průtoková cytometrie umožňuje zkrácení analýz vzorků buněčných suspenzí, poskytuje vhled do heterogenity buněčných populací a zvyšuje statistickou relevanci analýz. Sběrem dat představujících informace o každé jednotlivé buňce v analyzovaném vzorku představuje metodu, která zpřístupňuje informace, které klasickými metodami analýzy metabolitů, jako GC a HPLC, nejsou dostupné. Průtoková cytometrie je po této stránce vysoce atraktivní v různých oblastech průmyslové aplikace i v rámci vědeckého zkoumání.

V rámci mikrobiologického a biotechnologického výzkumu probíhajícího na kvasinkách našla průtoková cytometrie mnohá uplatnění. Jedním z příkladů může být mikrobiologická kontrola kvality potravin, v citovaném případě vyhodnocení kvality vína [58] spočívající ve stanovení počtu a viability kvasinek (rodu *Saccharomyces*) a bakteriálních kultur, které mohou být ve víně přítomny. I v pekárenském průmyslu nachází průtoková cytometrie uplatnění. Viabilita kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je dosti zásadní pro průběh procesů souvisejících s přípravou těsta. Pomocí cytometrie je tak kontrolována kvalita rehydratovaných kvasničných lyofilizátů, běžně v pekárenství užívaných [59].

Zjišťování životaschopnosti buněk a jejich počtu ve vzorku jsou důležité, ale ne jediné údaje zjistitelné pomocí průtokové cytometrie. Průmyslově významná jsou zjištění týkající se metabolických procesů odehrávajících se uvnitř buněk v průběhu kultivačních procesů. Hlubší porozumění těmto procesům zvýší možnosti do těchto procesů aktivně a řízeně zasahovat tak, aby byla navýšena výkonnost dané biotechnologie. V případě kvasinek může jako příklad

posloužit barvení fluoresceindiacetátem [60], u kterého byl v citované práci zaznamenán vztah mezi intenzitou fluorescence a vnitrobuněčným obsahem ergosterolu a glykogenu.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je nejen biotechnologicky významná, ale také podstatná pro základní výzkum jako modelový organismus – nejjednodušší typ úplné eukaryotické buňky. Metody průtokové cytometrie umožňují získat informace o průběhu regulace buněčného cyklu [61] a také dobře slouží při studiu interakcí protein-protein [62], kde výrazně urychlují výzkum.

Co se studia karotenogenních kvasinek týče, existuje možnost přinejmenším orientačně stanovovat celkové množství karotenoidů v buňkách [63; 64] a v kombinaci s využitím schopnosti cytometru počítat buňky, resp. určit koncentraci buněk, pak stanovit množství karotenoidů v objemu kultury. Tím lze elegantně obejít nutnosti náročné a nespolehlivé extrakce a zkrátit dobu získání výsledků (z přibližně 80 minut na 5-10 minut na jeden vzorek). To je obzvláště významné při screeningu, kdy je nutné analyzovat velké množství vzorků, stejně jako při optimalizacích.

2.8.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie se zabývá zobrazováním fluorescence reálných objektů (např. buněk) za pomoci optických mikroskopů. V základním uspořádání se pro výběr excitačních a emisních vlnových délek používají optické filtry. U pokročilejších (a dražších) přístrojů lze excitovat jednou či více definovanými vlnovými délkami – prostřednictvím užití laserů. Další možností zdokonalení je konfokální mikroskopie, tedy varianta optické mikroskopie umožňující vyšší rozlišení díky clonce s otvorem (pin hole), která umožňuje na detektor dopadnout jen světlo z fokální (ohniskové) roviny. Světlo z mimoohniskových rovin je zadrženo clonkou a tak při pořizování snímku neruší, nerozostřuje obraz. Konfokální systémy se užívají v kombinaci se skenery, umožňující postupné bodové snímání obrazu zkoumaného objektu. Princip funkce skenerů může spočívat v systému zrcadel, které odchyľují excitační paprsek, nebo (častější, modernější varianta) piezoelektrické skenery pohybují s objektivem nebo držákem vzorku [47]. Skenováním vzorku bod po bodu v kombinaci s přeastřováním ve vertikálním směru lze získat obrazová data, která zpracováním pomocí softwarových nástrojů lze transformovat do třírozměrných modelů zkoumaných objektů. U laserové skenovací konfokální mikroskopie (LSCM) se jako zdroj světla užívají lasery, tedy zdroje s vysokou intenzitou umožňující v dostatečné míře excitovat i málo koncentrované fluorofory nebo fluorofory s nízkým kvantovým výtěžkem, jako jsou např. karotenoidy.

"Fluorescence lifetime imaging microscopy" (FLIM) – mikroskopie zobrazování doby života fluorescence je pokročilou variantou LSCM, která využívá vysoce citlivé elektroniky, jenž dovede rozlišovat časování proudových pulzů (vyvolaných dopadem fotonů na fotonásobič) s přesností v řádu pikosekund. Díky tomu lze velice přesně zaznamenávat vyhasínací křivky fluorescence. Tyto křivky lze v případě více fluoreskujících specií ve vzorku proložit vhodným modelem a získat informace – včetně identifikace – o speciích. FLIM již byla diskutována výše v kapitole 2.7.5 Základní uspořádání optických prvků experimentu je shodné jako u LSCM.

2.8.6 Fluorescenční mikroskopie kvasinek

Nejčastější kvasinkou zkoumanou pod objektivem mikroskopů je *S. cerevisiae*, a to

z prostého důvodu, že tato kvasinka slouží jako modelový eukaryotický organismus. Rozsáhlá review zabývající se zkoumáním této kvasinky pomocí LSCM je [65]. Ve zmíněné práci je rozsáhle diskutováno barvení intracelulárních komponent jako glykogenová zrna a lipidické kapénky, vakuoly (vakuolové membrány), nukleové kyseliny a jizvy po pučení. Diskutováno je i několik užití GFP-modifikovaných proteinů pro studium genové exprese a metabolických drah.

Odstavec Tato diplomová práce se zabývá neutrálními zásobními lipidy a karotenoidy, tedy metabolismem lipidů karotenogenních kvasinek, který byl i u *S. cerevisiae* zkoumán a zobrazován pomocí LSCM. Ukázalo se, že lipidická tělíska (lipid bodies, LB) nejsou pouhým skladištěm zásobních lipidů, ale hrají důležitou roli při degradaci proteinů, mohou být dočasným skladištěm proteinového materiálu a jsou důležité i ve vnitrobuněčné signalizaci [66; 67; 68].

V [6] bylo navrženo, že morfologické změny LB mohou indikovat (jsou ovlivněny) procesy udržující rovnováhu (homeostázi) neutrálních lipidů a fosfolipidů. Některé z červených kvasinek jsou schopné akumulovat obzvláště vysoká množství lipidů ve formě obřích („supersized“) LB, které mají v průměru i více než 1 μm . Obdobně velké LB byly zkoumány u *S. cerevisiae* pomocí fluorescenční mikroskopie a bylo zjištěno, že za vznikem těchto „supersized“ LB stojí koalescence menších LB, pravděpodobně způsobená vysokým množstvím kyseliny fosfatidové a fosfatidylethanolaminu [7]. Nový vhled do metabolismu lipidů červených kvasinek situaci ještě více komplikuje – v [69] zjistili, že v *R. glutinis* existuje další mechanismus syntézy triacylglycerolů, odlišný od syntézy v endoplasmatickém retikulu, která vede ke vzniku LB. Mechanismus spočívá na odhalené existenci cytosolické diacyltransferázy. Příspěvek tohoto mechanismu do formace LB a jejich proměn je prozatím neznámý.

Je vidět, že prací zabývajících se aplikací metod fluorescenční mikroskopie na *S. cerevisiae* je mnoho a přinášejí své plody. Ovšem červené kvasinky jsou v mnoha ohledech, včetně tohoto, neprozkoumané. Souvislosti metabolismu triacylglycerolů a karotenoidů s morfologií LB jsou u těchto kvasinek neznámé. Fluorescenční mikroskopie, zkoumající karotenoidy k červených kvasinkách je pak unikátním projektem – na základě našich znalostí a dostupných informací existuje pouze jedna jediná vzdáleně podobná práce [70]. Tato práce ovšem byla zaměřena pouze na kvantifikaci karotenoidů pomocí měření intenzity fluorescence při klasické LSCM. Časově rozlišené měření fluorescence nebylo realizováno. Zkoumání metabolismu lipidů a karotenoidů pomocí této metody zobrazování byl navržen, ale již ne realizováno. Znalosti o tvorbě a skladování těchto molekul jsou ovšem velmi důležité pro biotechnologii. Znamenají totiž možnost lépe pochopit a tak i lépe ovlivnit metabolismus s cílem navýšit výtěžky.

2.8.7 Extrakce

Opravdu efektivní technika extrakce karotenoidů z buněk červených kvasinek, opatřených velmi odolnou buněčnou stěnou, zůstává nedořešeným problémem komplikujícím průmyslové uplatnění těchto organismů. Rozpad buněčné stěny např. působením silných minerálních kyselin je možný, ovšem za daných podmínek degradují karotenoidy. Enzymatické přístupy k rozrušování buněčné stěny byly také ozkoušeny [71; 72], ale z průmyslového hlediska se potýkají s obvyklými problémy – citlivost enzymů k podmínkám prostředí, jejich cena,

dostupnost a kvalita a možnost regenerace. Byly popsány výtěžky jednokrokové extrakce superkritickým CO₂ [73], až 84% pro celkové karotenoidy ve srovnání s množstvím získaným mnohonásobnou extrakcí acetonem. Mezi klasické laboratorní metody patří mechanická desintegrace v třecí misce za pomoci skleněných kuliček, písku nebo dalších brusných materiálů, jako solvent na izolaci karotenoidů ze získané směsi se používá nejčastěji aceton, ale také dimethylsulfoxid nebo petrolether jako extrakční činidlo [74; 75].

Již výše zmíněná superkritická fluidní extrakce (SFE) je v současnosti často zkoušenou alternativní metodou pro získávání metabolitů. Nejobvyklejší je, vzhledem k široce výhodným vlastnostem včetně netoxicity, použití superkritického CO₂. SFE je používána ve farmacii a potravinářství [76]. Hlavními důvody je netoxicity, vysoká kvalita získaných extraktů, slabá degradace extrahovaných látek a nevyžaduje složité odstraňování rozpouštědla. Superkritické CO₂ je nepolárním solventem, jehož extrakční účinnost závisí na hustotě superkritického fluida, rostoucí s tlakem. Součástí fluida může být i organický kosolvent – modifikátor, který zvyšuje rozpustnost polárnějších molekul (je zásadou, že musí být dobrým rozpouštědlem cílového metabolitu už v klasickém kapalném stavu [77]). Extrakce s čistým CO₂ dostala svého uplatnění u extrakce karotenoidů z řas, optimum teplot zde bylo v rozmezí 40-60 °C při tlacích v rozmezí 30 - 40 MPa [78; 79]. Kosolventová SFE karotenoidů obvykle využívá ethanolu jako kosolventu, především jedná-li se o extrakci astaxanthinu [73; 42]. Tento kosolvent je vhodný jen tehdy, jedná-li se opravdu o extrakci polárnějších molekul (jako astaxanthin), jinak klesá výtěžnost (např. pro β-karoten) a navíc jen nutné ethanol z extraktu odstranit zahřátím, což může vést k částečné degradaci produktu. Příkladem aplikace ethanolu jako kosolventu je extrakce astaxanthinu z buněk *Phaffia rhodozyma* [73]. Další možností kosolventu je přidavek rostlinných olejů, které vedou ke stabilizaci a ochraně karotenoidů před degradací [78] a zároveň v nich zůstanou karotenoidy rozpuštěny po odpaření CO₂ – ve formě, která je velmi vhodná k manipulaci a aplikaci např. v potravinářství.

2.8.8 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je separační metodou využívající rozdílnou distribuci molekul analytů mezi stacionární a mobilní fází, tedy rozdíly v afinitě analytu k mobilní/stacionární fázi. Karotenoidy jsou lipidické molekuly nepolárního charakteru, které se mezi sebou odlišují stupněm (a polohou) oxidace; kyslík obsahující funkční skupiny vnášejí do molekuly polaritu. Převládající nepolární charakter je předurčuje k separaci na nepolárních kolonách metodou HPLC na reverzní fázi (RP HPLC). Jako eluční činidlo se tedy používá polární organické rozpouštědlo nebo směs takových rozpouštědel. Malý přidavek vysoce polárních rozpouštědel, jako např. vody, výrazně zvyšuje separační účinnost pro analyty polární povahy – mezi karotenoidy za takové lze uvažovat astaxanthin a torularhodin. Při analýze karotenoidů lze použít eluční režim isokratický i gradientový. V případě gradientové eluce v průběhu analýzy klesá zastoupení polárních složek v mobilní fázi [74]. Jako mobilní fáze jsou obvykle používány methanol [56], methanol:acetonitril [63], acetonitril:tetrahydrofuran:voda [75], součástí směsi může být i aceton [74].

Určení identity píku je možné v zásadě realizovat dvěma způsoby – srovnáním vlastností eluovaného analytu se známými vlastnostmi látek (spektrální charakteristiky, hmotnostní spektra) nebo (v případě hlubší znalosti zkoumaného systému/směsi) porovnáním

s retenčními časy dostupných standardů při daných separačních podmínkách (kolona, průtok a složení mobilní fáze, teplota). Pro realizaci kvantitativní analýzy se použije koncentrační řada standardu, přičemž obsah analytu v daném kalibračním roztoku/ve vzorku se stanovuje pomocí plochy píku odpovídajícího analytu.

V rámci zkoumání produkce karotenoidů u karotenogenních kvasinkách je k dispozici pouze standard β -karotenu, torularhodin a torulen nikoli. Tyto sloučeniny se obvykle stanovují porovnáním ploch jejich píků s píkem β -karotenu [75; 63] a předpokládá se, že odezva detektoru na tyto analyty je přibližně shodná vzhledem k jejich podobnostem (struktura molekuly, absorpční spektrum).

2.8.9 Plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem (GC-FID)

Plynová chromatografie je separační technikou vhodnou k analýze těkavých látek. Látky, které nejsou těkavé, je nutné vhodnou modifikací převést na těkavé deriváty (např. převedení mastných kyselin na methylestery), jinak nejsou pro analýzu na GC vhodné. Mobilní fází je plyn, který v ideálním případě nijak neinteraguje s analyty vzorku. Nejobvyklejšími jsou vodík, dusík a helium, přičemž posledně zmíněný plyn je sice obzvláště dobrou mobilní fází, ovšem drahou, obzvláště poté, co se helium stalo strategickou surovinou. Minimum interakcí mezi mobilní fází a analyty znamená, že separace je určována interakcí stacionární fáze-analyty. Stacionární fáze bývá ve formě náplňových anebo častěji kapilárních kolon. Ty jsou tvořeny dutou kapilárou z křemene, která je na svém vnějším povrchu obalena ochrannou vrstvou (obvykle polyimid). Vnitřní stěny kapiláry mohou být potaženy stacionární fází. Délka kolony (10 až 150 m) a malý vnitřní průměr (desítky až stovky mikrometrů) dohromady dávají velkou separační plochu. Separace na kapilárních kolonách tak znamená vysokou separační účinnost.

Použití plamenového ionizačního detektoru (Flame Ionization Detector, FID) je v plynové chromatografii velmi obvyklé, protože se jedná o v podstatě univerzální detektor pro organické sloučeniny s širokým rozsahem koncentrací, ve kterém je odezva detektoru lineární. Detekce spočívá v tvorbě iontů při spalování analytu ve vodíkovém plameni, který je umístěn za vývod z kolony. Množství vznikajících iontů je přitom úměrné množství analytu. Plamen je umístěn v prostoru mezi dvěma elektrodami, na které je aplikováno napětí, vznikající ionty jsou tak dle svého náboje urychlovány k jedné z elektrod.

3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené diplomové práce zaměřené na použití instrumentálních technik ke studiu karotenogenních kvasinek je řešení dílčích úkolů:

1. kultivace vybraných druhů/kmenů karotenogenních kvasinek
2. komplexní charakterizace metabolické aktivity buněk kvasinek průběhu jednotlivých růstových fází se zvláštním zaměřením na lag fázi růstu
3. sledování změn koncentrace vybraných metabolitů v buňkách i subbuněčných frakcích kvasinek pomocí pokročilých instrumentálních metod
4. posouzení získaných výsledků z hlediska biotechnologického využití kvasinek

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a složky kultivačních médií

Kvasničný autolyzát, Himedia (Indie)
D-glukóza monohydrát p.a., Lach-Ner s r.o. (ČR)
Síran amonný p.a., Lachema (ČR)
Dihydrogenfosforečnan draselný p.a., Lachema (ČR)
Síran horečnatý heptahydrát p.a., Lachema (ČR)
Methanol pro HPLC, Carl Roth (SRN)
Chloroform pro HPLC, Carl Roth (SRN)
Acetonitril pro HPLC, Carl Roth (SRN)
Hexan pro HPLC, Carl Roth (SRN)
Nílská červeň pro mikroskopii, Sigma-Aldrich (SRN)
 β -karoten HPLC standard, Sigma-Aldrich (SRN)
Supelco 37 component FAME mix, směs standardů 37 MEMK, Sigma-Aldrich (SRN)
Ergosterol HPLC standard, Sigma-Aldrich (SRN)
koenzym Q HPLC standard, Sigma-Aldrich (SRN)
lecithin z vaječného žloutku lyofilizovaný, Sigma-Aldrich (SRN)

Ostatní použité chemikálie byly vesměs čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

4.2 Přístroje a pomůcky

4.2.1 Kultivace kvasinek a stanovení biomasy

Spektrofotometr VIS, Helios δ , Unicam (UK)
Třepačka IKA Yellow Line, (SRN)
Centrifuga Sigma Laborzentrifugen (SRN)
Analytické váhy Boeco (SRN)
Průtoková komora FCS2, Biopetechs (USA)
Vzduchovací motorek AQUA NOVA NA-200, AQUA NOVA (Polsko)
Zkumavky 160×16 mm, síla stěny 1 mm, Verkon (ČR)
Fermentor Biostat® B, 5 litrů, Sartorius (SRN)

4.2.2 Izolace a analýza karotenoidů

Filtry 0,45 μ m pro HPLC, PRE-CUT, Alltech (GB)
Vakuová odparka RV 06, IKA (SRN)

Sestava na HPLC/PDA:

Sestava HPLC/MS (Thermo Fischer Scientific, USA)
Termostat - LCO 101, Column Oven (ECOM, ČR)
Pumpa - MS Pump Plus, Finnigan SURVEYOR
Detektor PDA - PDA Plus Detector, Finnigan SURVEYOR
Vyhodnocovací systém Xcalibur
Kolona Kinetex C18, 5 μ m, 4,6 x 150 mm, Phenomenex
Držák předkolony - KJ0 - 4282, ECOM (ČR)

Předkolona - C18, AJ0 - 4287, Phenomenex

4.2.3 Plynová chromatografie

Chromatograf Trace GC Ultra, s FID detektorem, Finnigan (USA)

Kolona Agilent DB WAX 30 m, průměr 0,25 mm, Agilent Technologies (USA)

4.2.4 Fluorescenční metody

Průtokový cytometr Apogee A50, ApogeeFlow Systems (UK)

Časově rozlišený laserový skenovací konfokální mikroskop MicroTime 200, PicoQuant (SRN) s hlavami s pikosekundovými laserovými diodami a vyhodnocovacím systémem SymPhoTime

4.3 Mikroorganismy

Ke kultivaci byly užity kvasinkové kmeny:

Cystofilobasidium macerans CCY 17-19-3

Sporobolomyces shibatanus CCY 19-20-3

Cystofilobasidium capitatum CCY 10-1-2

4.4 Příprava a měření modelových systémů

Micely byly připraveny jako micely SDS:ergosterol:beta-karoten a SDS:koenzym Q10:beta-karoten. Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých složek v chloroformu. Složky byly pipetovány do připravených mikrozkrumavek typu Eppendorf tak, aby koncentrace ergosterolu/koenzymu Q10 byla ve výsledném roztoku v rozmezí 0-1,25 mM, koncentrace SDS konstantně 12 mM a koncentrace beta-karotenu konstantně 0,1 mM. Chloroform byl volně odpařen v digestoři a odparek byl hydratován 1 ml přečištěné vody za působení ultrazvuku (sonikátor Powersonic PS 02000) po dobu 20 minut.

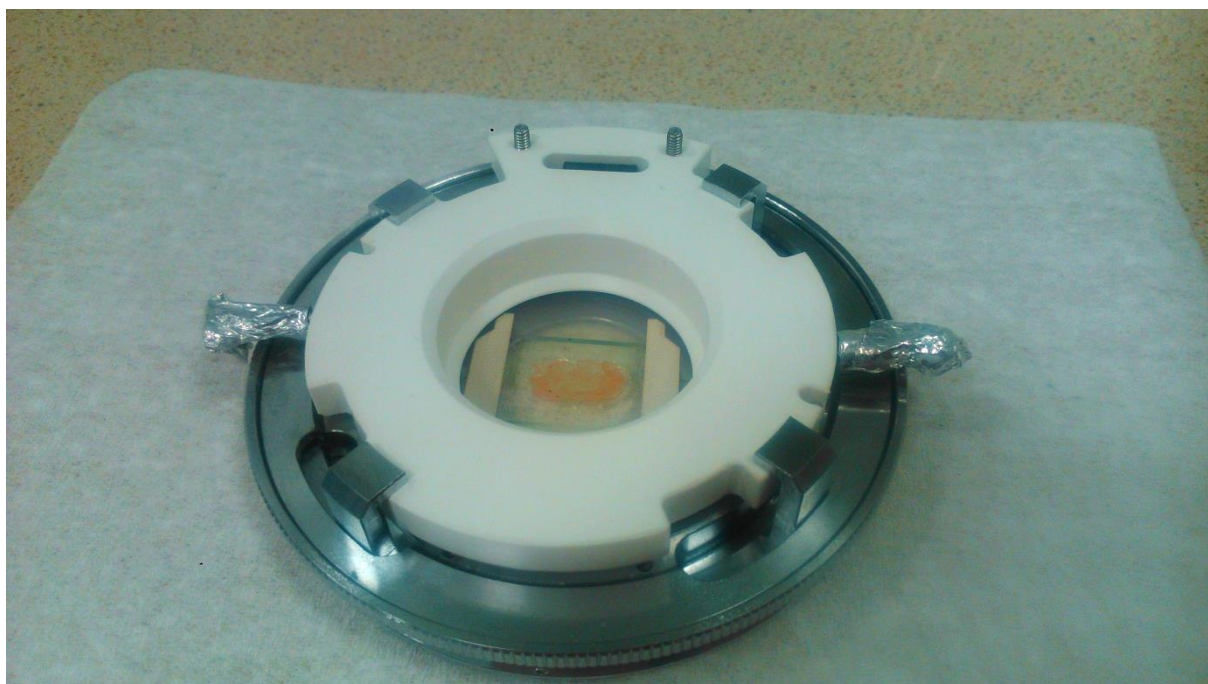
Dále byly připraveny liposomy lecithin:ergosterol:beta-karoten evaporací tenké vrstvy a následnou ultrazvukovou hydratací obdobně jako micely. Koncentrace β -karotenu byla pro všechny roztoky liposomů konstantní 0,6 μ M, obdobně pro lecithin konstantně 1,2 mM při proměnlivé koncentraci ergosterolu v rozmezí 0,012 až 0,5 mM.

Připravené roztoky byly proměřeny metodou TCSPC při 470 nm excitaci za použití emisního filtru BP520/35, na přístroji MicroTime (PicoQuant, SRN). Vzorky byly měřeny tak, aby v maximu vyhasínací křivky bylo zaznamenáno 10 000 událostí. Z naměřených vyhasínacích křivek byly pomocí programu SymPhoTime vypočteny doby života a amplitudy jednotlivých časů.

4.5 Kultivace v průtokové komoře

Do sterilní průtokové komory FCS2 (Biopetechs, USA, Obrázek 13) byly na sklíčko rozetřeny kvasinky *Cystofilobasidium capitatum* přenesené sterilně kličkou ze zásobní kultury na Petriho misce. Uzavřená komora byla umístěna na stolek mikroskopu MicroTime a byly k ní připojeny sterilní hadičky pro vtok a odtok média. Médium bylo složení (v g/l) glukóza 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; KH_2PO_4 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,696; kvasničný autolyzát 7; a bylo probubláváno vzduchem sterilovaným přes 0,22 μ m PTFE filtr. Vzduch byl do média probubláván pomocí akvarijní pumpy AQUA NOVA NA-200 s průtokem 200 l/h a pro přísun média byla použita peristaltická pumpa při ověřené nastavené rychlosti dávkování 10 μ l/min,

příčemž po dobu pořizování snímků byl průtok zastaven. Teplota při kultivaci byla udržována při 22 °C. Byl sledován vývoj kvasinkové kultury metodou FLIM.



Obrázek 13: Průtoková komora FCS2 od Biopetechs. Uvnitř plátek agaru s rozetřenou kulturou

Obdobný experiment byl realizován pro kultivaci na pevném médiu, tedy bez průtoku média – do průtokové komory bylo navrstveno 250 μ l živného agaru (stejné složení jako živné médium + 20 g/l agar), na kterém byly rozetřeny kvasinky sterilně přenesené ze zásobní kultury.

FLIM bylo v obou případech provedeno s následujícím nastavením: excitace laserem 467 nm s frekvencí 80 MHz a intenzitou v rozmezí 4,5-5,5 μ W, s časem pobytu 2 ms/pixel a obvyklým rozlišením 228×228 pixelů.

4.6 Kultivace *Cystofilobasidium capitatum* ve zkumavkách

Bylo připraveno inokulační médium o složení (v g/l) glukóza 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; KH_2PO_4 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 0,696; kvasničný autolyzát 7. Do 50 ml inokula v 250ml Erlenmeyerově baňce bylo vneseno pět velkých kliček zásobní kultury z Petriho misky. Kultivace byla vedena při 25 °C za konstantního osvětlení (11 W, 15cm, studené bílé světlo) a třepání na reciproké třepačce při 110 RPM po dobu 20 hodin.

Byla naplánována kultivace ve třiceti zkumavkách (160×16 mm, síla stěny 1 mm) s 5 ml média shodného složení, jaké mělo médium inokulační. Do každé zkumavky bylo sterilně zaočkováno 0,5 ml inokula. Zkumavky byly umístěny na reciprokou třepačku tak, aby k třepání docházelo ve směru osy zkumavek. Úhel sklonu zkumavek byl přibližně 10°. Frekvence třepání byla nastavena na 180 RPM, osvětlení a teplota shodné jako v inokulačním kroku.

Ve vhodných časových intervalech byly odebírány vzorky – pro daný čas byla vyhrazena vždy jedna zkumavka. Po vhodném zředění suspenze bylo změřeno OD při 630 nm, vzorky pro měření OD se ředily tak, aby se cílová absorpance pohybovala zhruba v rozmezí 0,2 - 0,6.

Nezředěná, příp. mírně zředěná suspenze byla nakápnuta na podložní sklíčko umístěné v držáku vzorků pro měření na CLSM a následně překryta zhruba dvojnásobným objemem 2% agarosu v destilované vodě za účelem imobilizace buněk. Autofluorescence kvasničných buněk byla snímkována při excitaci laserem 467 nm s frekvencí 80 MHz a intenzitou v rozmezí 0,3-5 μ W, s časem pobytu 1,4 ms/pixel a obvyklým rozlišením 356×356 pixelů.

4.7 Fermentorová kultivace *Cystofilobasidium capitatum*

Byly realizovány dva inokulační stupně. První byl 100 ml inokulačního média (zaočkovaných 5 velkými kličkami ze zásobní kultury na Petriho misce) v 250 ml Erlenmeyerově baňce, kultivováno při 25 °C na reciproké třepačce při 110 RPM po dobu 14 hodin tak, aby inokulační kultura byla převedena do dalšího stupně v exponenciální fázi. Druhý stupeň byl 500 ml inokulačního média (celkem 600 ml inokula) v 1000 ml lahvi se šroubovacím uzávěrem, v němž pro přísun kyslíku volně ze vzduchu byly umístěny dva hadičkové porty opatřené krátkými hadičkami zakončenými 0,22 μ m PTFE filtry pro sterilizaci vstupujícího vzduchu. Druhý inokulační stupeň byl kultivován při 25 °C na orbitální třepačce při 170 RPM po dobu 14 hodin. Následně byl přes hadičkový port dávkován peristaltickou pumpou do sterilního fermentoru s médiem.

Složení inokulačního média (pro oba kroky) bylo následovné (v g/l): glukóza 40; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; KH_2PO_4 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,696; kvasničný autolýzát 7.

Složení produkčního média ve fermentoru bylo (v g/l): glukóza 30; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4; KH_2PO_4 4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,696. Byly připraveny 3 L média do 5L fermentoru Sartorius Biostat® B plus. Byly zapojeny sondy pro měření pH, pO_2 , turbidity a redoxního potenciálu, ostatní otvory byly utěsněny nebo opatřeny hadičkami (v případě dávkovacích portů) s hadicovými svorkami. Sonda pH byla kalibrována pomocí komerčně dostupných pufrů s pH 4,00 a 7,01 (Hamilton Duracal Buffer). Připravený fermentor byl sterilován při 120 °C po dobu 15 min. Po ochlazení byly zapojeny sondy, chladicí okruh, přívod vzduchu, báze (30% NaOH), kyseliny (1M H_2SO_4), odpěňovače a inokula. Byla zahájena temperace média na 28 °C a následně byla kalibrována pO_2 sonda. pH bylo nastaveno na hodnotu 6,5, pO_2 na 30% při průtoku vzduchu 1,5 l/min. Bylo nadávkováno inokulum a zahájena produkční fermentace. Po vstupu kultury do stacionární fáze (posuzováno dle křivky turbidity a míchání) bylo zapnuto externí osvětlení kultivační nádoby lampou Argus Light G23/11W se zářivkou o výkonu 11 W ze vzdálenosti cca 10 cm od vnější stěny nádoby.

V průběhu kultivace byly odebírány vzorky pro měření na průtokovém cytometru (1 ml) a FLIM (1 ml), zpočátku s intervalem 45 min až jedna hodina a postupně se prodlužujícím až na 4 hodiny. Také byly odebírány vzorky na stanovení triacylglycerolů a karotenoidů (společný vzorek 10 ml) v intervalech 4-6 hodin. Vzorky na průtokovém cytometru a FLIM byly ihned analyzovány, vzorky na stanovení karotenoidů a triacylglycerolů byly zamrazeny k pozdějším analýzám. Po rozmrazení těchto vzorků a centrifugaci byl využit supernatant pro stanovení reziduálních cukrů v médiu.

4.8 Fermentorové kultivace *Cystofilobasidium macerans* a *Sporobolomyces shibatanus*

Tyto kultivace probíhaly dle stejného schématu jako výše uvedená kultivace *Cystofilobasidium capitatum*, ovšem se změnami v kultivačních podmínkách produkční

fermentace: bylo použito 60 g/l glukózy (obsah dalších složek produkčního média zůstal nezměněn, pH bylo sníženo na 5,5 z původních 6,5 a pO_2 bylo sníženo na 20%. U těchto fermentací byl spolu se vzorkem na stanovení karotenoidů a lipidů odebírán vzorek 10 ml suspenze na gravimetrické stanovení sušiny.

4.9 Analýza vzorků z fermentorů pomocí průtokové cytometrie

Všechny vzorky byly analyzovány na přístroji Apogee A50 za podmínek uvedených v následující Tabulce 1:

Tabulka 1: Nastavení průtokového cytometru Apogee A50 pro analýzu kvasničných kultur

Objem vzorku		100 μ l
Rychlost průtoku vzorku		4,17 μ l/min
Přetlak pláštěvé tekutiny		150 mbar
Napětí na fotonásobičích	SALS	200 V
	LALS	400 V
	FL1 (535 nm, BP 35 nm)	500 V
	FL2 (590 nm)	500 V
	FL3 (680 nm, BP 35 nm)	500 V
	FL4 (LP 740 nm)	500 V
Lasery (laserové diody)		488 nm
		635 nm
Trvání analýzy		30 s

Kromě měření autofluorescence bylo realizováno také barvení Nilskou červení pro zjištění obsahu lipidů v buňkách kvasinek. K 1 ml buněčné suspenze byly přidány 2 μ l zásobního roztoku Nilské červeně (1 mg/ml v acetonu) a vzorek byl následně inkubován 5 minut při laboratorní teplotě (20-25 °C). Hned poté byl analyzován pomocí průtokového cytometru za shodných podmínek jako jsou uvedeny výše.

4.10 FLIM snímkování vzorků z fermentorů

Vzorek byl nakápnut (několik μ l) na podložní sklíčko umístěné v držáku vzorků pro CLSM a byl převrstven zhruba dvojnásobným objemem 2% agarosy v destilované vodě. Po zatuhnutí agarosy byl vzorek snímkován na CLSM MicroTime 200, s objektivem Olympus UPLSAPO 60XW s 60-násobným zvětšením a vodní imerzí. Pro excitaci byla použita laserová dioda 467 nm s nastavenou frekvencí pulzů 80 MHz, s výkonem měněným dle vlastností buněk (viz Tabulka 2 níže), pro výběr emisních vlnových délek optický filtr BP520/35. Čas pobytu byl 2 ms/pixel, rozlišení snímků 228×228 pixelů. Pro každý vzorek byly pořízeny alespoň 2-3 snímky.

Tabulka 2: Nastavení intenzity laseru pro měření vzorků z fermentorů

Organismus	Intenzita laseru (μ W)
<i>C. capitatum</i>	10-30

<i>C. macerans</i>	2-3
<i>S. shibatanus</i>	2,5-3,5

4.11 Izolace lipidů

Vzorky byly rozmrazeny a centrifugovány 5 minut při 3 000 RCF. Supernatant byl odlit a uschován pro analýzu reziduálních cukrů v médiu, zatímco pelet byl promyt destilovanou vodou a znovu centrifugován (za stejných podmínek). Pelet byl vypláchnut postupnými dávkami Folchova činidla (chloroform:methanol 2:1; celkem asi 10 ml) do polypropylenové zkumavky a byla k němu přidány skleněné kuličky o průměru 100 µm v ekvivalentu asi poloviny objemu rozsuspendovaného peletu. Zkumavky s takto připravenými vzorky byly zazátkovány a dány na vortex po dobu 45 minut při 2 700 RPM a při výkonu 115 W. Roztok po tomto rozrušení buněk byl opatrně odpipetován do zkumavek, skleněné kuličky byly několikrát propláchnuty chloroformem až do zanedbatelného zbarvení roztoku. Proplachovací chloroform byl přidán do zkumavky s primárním extraktem a vzorky byly centrifugovány 5 minut při 3 000 RCF pro urychlení separace fází. Spodní chloroformová fáze byla opatrně kvantitativně odpipetována do baňky s kulatým dnem, která byla umístěna na rotační vakuovou odpadku. Zde byl chloroform odpařen při 50 °C, zdrojem vakua byla vodní vývěva.

Odparek byl rozpuštěn v 1 ml (příp. 2 ml) chloroformu HPLC kvality, přefiltrován přes 0,22 µm PTFE filtr a takto finálně zpracované vzorky byly před dalšími analýzami uchovávány při -40 °C.

4.12 Analýza karotenoidů pomocí HPLC

Byla použita izokratická eluce směsí acetonitril:methanol:chloroform 80:15:5 při průtoku 1 ml/min na nerezové koloně Kinetex C18 (2,6 µm, 4,6 x 150 mm, Phenomenex) s předkolonou, přičemž kolonový prostor byl temperován na 45 °C. K detekci byl použit PDA detektor, použitou vlnovou délkou pro kvantifikaci karotenoidů bylo 450 nm. K dávkování vzorku byl použit dávkovací ventil s velikostí dávkovací smyčky 20 µl.

Byla použita chromatografická sestava od firmy ECOM s.r.o (viz výše v sekci 4.2.2) a pro zpracování chromatografických dat byl použit software Xcalibur.

Pro stanovení koncentrace β-karotenu i ostatních karotenoidů v extraktech bylo použito kalibrační křivky získané pomocí proměření koncentrační řady roztoku standardu β-karotenu v chloroformu v rozmezí koncentrací 10-300 µg/ml.

Pro stanovení dalších karotenoidů jako je torulen a torularhodin (a tedy i celkových karotenoidů jakožto sumy ve vzorku přítomných karotenoidů) byla použita kalibrační křivka získaná měřením standardu β-karotenu. Pro identifikaci torulenu, torularhodinu a dalších karotenoidů byla použita známá UV-VIS absorpční spektra těchto látek.

4.13 Analýza mastných kyselin pomocí GC-FID

Z izolací získaných extraktů bylo odpipetováno 0,5 ml do 4,5 ml hexanu HPLC kvality ve zkumavkách a bylo přidáno 0,5 ml 30% methanolického KOH. Zkumavky byly uzavřeny a 8 minut manuálně třepány. Po ustálení a oddělení fází bylo z hexanové fáze odebrán 1 ml do zkumavek opatřených šroubovacím víčkem s PTFE-silikonovou membránou. Separace probíhala na 30 m koloně DB WAX (Agilent) s vnitřním průměrem 0,25 mm. Jako mobilní

fáze byl použit dusík. Pomocnými plyny pro analýzu ve FID detektoru pak vodík a vzduch.

4.14 Stanovení reziduálních cukrů v mediu dle Duboise

Ze supernatantů po centrifugaci buněčné suspenze byly ředěním připraveny vzorky tak, aby předpokládaná koncentrace sacharidů byla v rozmezí 10-100 µg/ml. K 1 ml takto rozředěného vzorku byl přidán 1 ml 5% fenolu ve vodě a 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Zkumavky byly řádně promíchány a ponechány 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance roztoků při 490 nm. Jako blank byl použit 1 ml destilované vody namísto zředěného supernatantu. Každý vzorek byl proměřen alespoň třikrát.

Pro určení koncentrace byla využita kalibrační křivka 20-100 µg/ml roztoků glukózy.

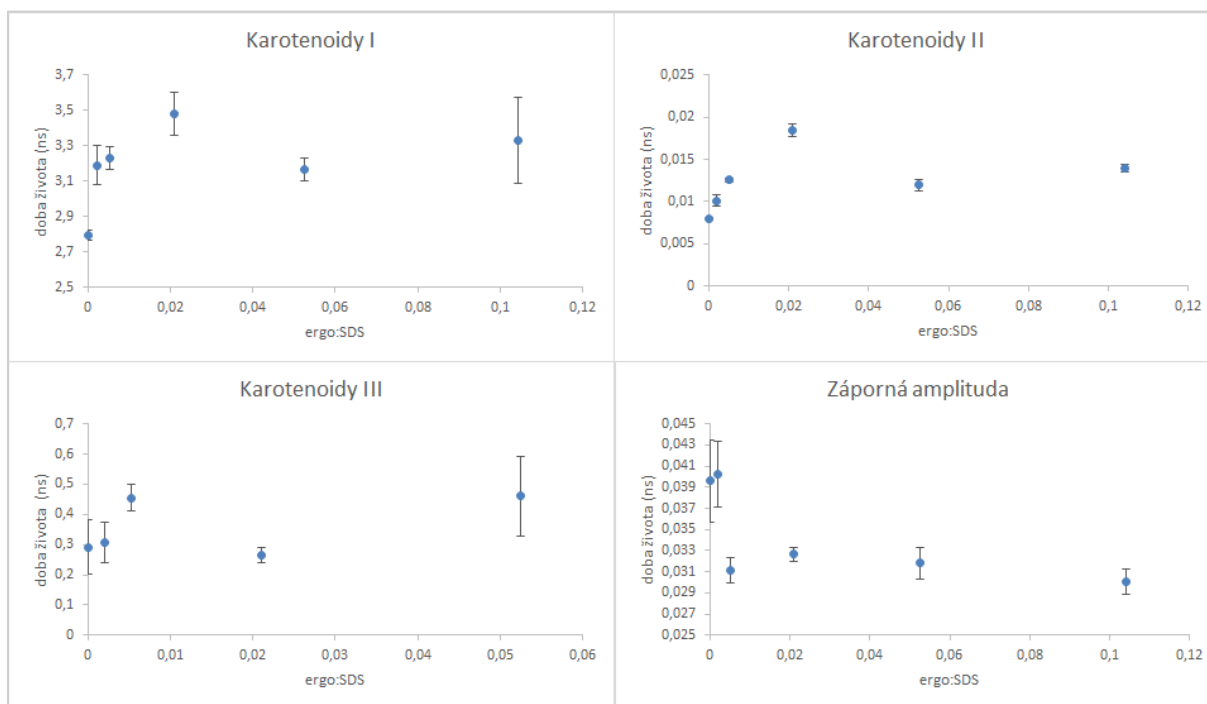
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Studium modelových systémů

Pro získání přehledu o různých fyzikálně-chemických formách, ve kterých se karotenoidy mohou v lipidických strukturách vyskytovat, byly provedeny experimenty měření doby života karotenoidů v lipozomech a micelách. Micely jsou uvažovány jako model pro transportní lipidické vložky v buňce a jako forma, v níž karotenoidy nejsou nikterak orientovány a jsou ve stavu velmi podobném roztoku. Lipozomy pak umožňují dobře pozorovat, jaká je doba života karotenoidů v membránových systémech. Pro zvýšení relevance byly experimenty s lipozomy a micelami provedeny s různými přísadami látek omezujících viskozitu lipidických struktur (ergosterol, koenzym Q10). Experimenty byly realizovány dle postupu uvedeného v kap. 4.4

Zavedme následující označování dob života karotenoidů v různých lipidických strukturách. Nejdelší doby života, a tedy pravděpodobnou membránovou formu (viz níže) v rozmezí 2 - 4 ns označme Karotenoidy I, nejkratší dobu (karotenoidy volně v roztoku) s časem v rozmezí 1 - 50 ps pak označme Karotenoidy II. Pravděpodobnou transportní vložkovou formu s časem okolo 300 ps označme Karotenoidy III. Další vložkovou formu s dobou života obvykle v rozmezí 1 - 1,2 ns označme Karotenoidy IV.

Nejprve bude uveden přehled toho, co bylo pozorováno při studiu micel tvořených SDS, β -karotenem a ergosterolem/koenzymem Q10.



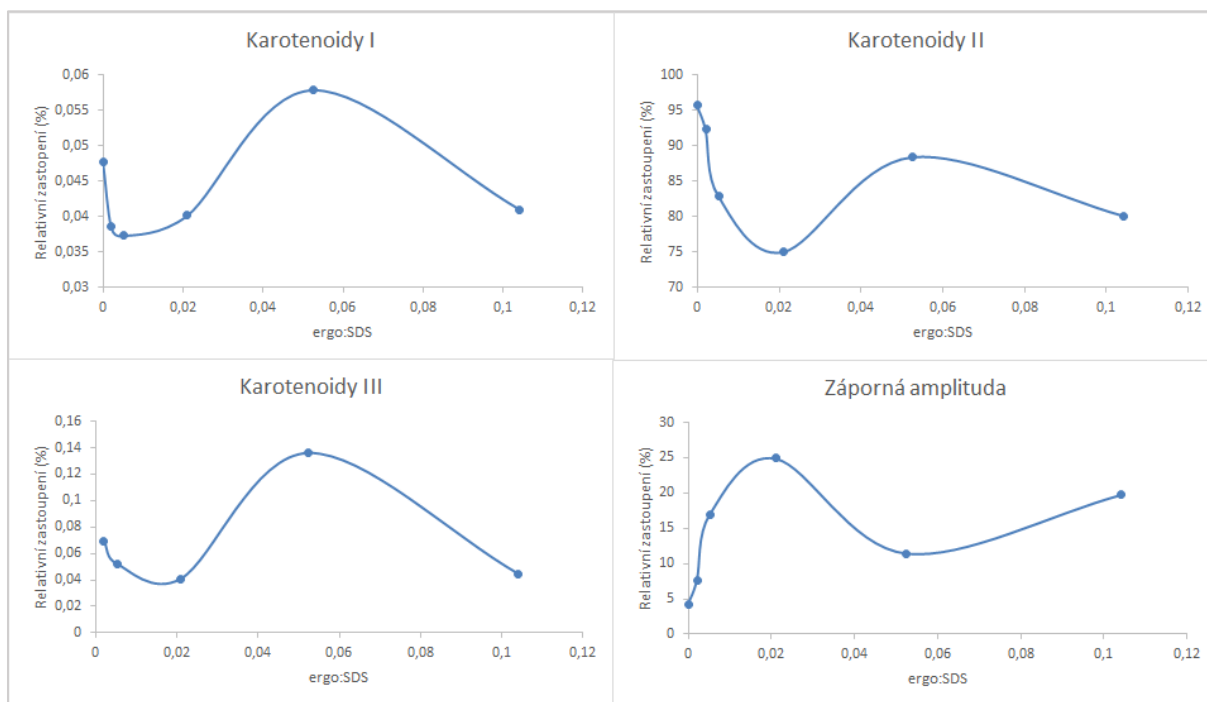
Graf 1: Doby života karotenoidů v micelách SDS:β-karoten:ergosterol

Na Graf 1 lze vidět, jak se měnila délka jednotlivých dob života s rostoucí koncentrací ergosterolu v micelách, resp. s rostoucím poměrem ergosterol:SDS. Pro membránovou formu Karotenoidy I lze vidět s nárůstem ergosterolu (tedy s poklesem fluidity prostředí) vzestup doby života, ukazující na stabilizovanější excitovaný stav β -karotenu ve strukturně rigidnějších micelách. Od zhruba 2% ergosterolu v SDS micelách tento trend ustává a zvýšení

koncentrace ergosterolu nevede k dalšímu zvyšování doby života karotenoidů. Obdobná je situace s Karotenoidy II, tedy „roztokovou formou,“ kterou lze předpokládat uvnitř, v jádru micel. Vzhledem k amfifilní povaze ergosterolu se bude tato molekula zdržovat při povrchu micely, zvyšováním koncentrace ergosterolu je tak pravděpodobně dosaženo stabilizace dvou vrstev v micelle – povrchové (amfifilní) obálky a vnitřního ryze hydrofobního jádra.

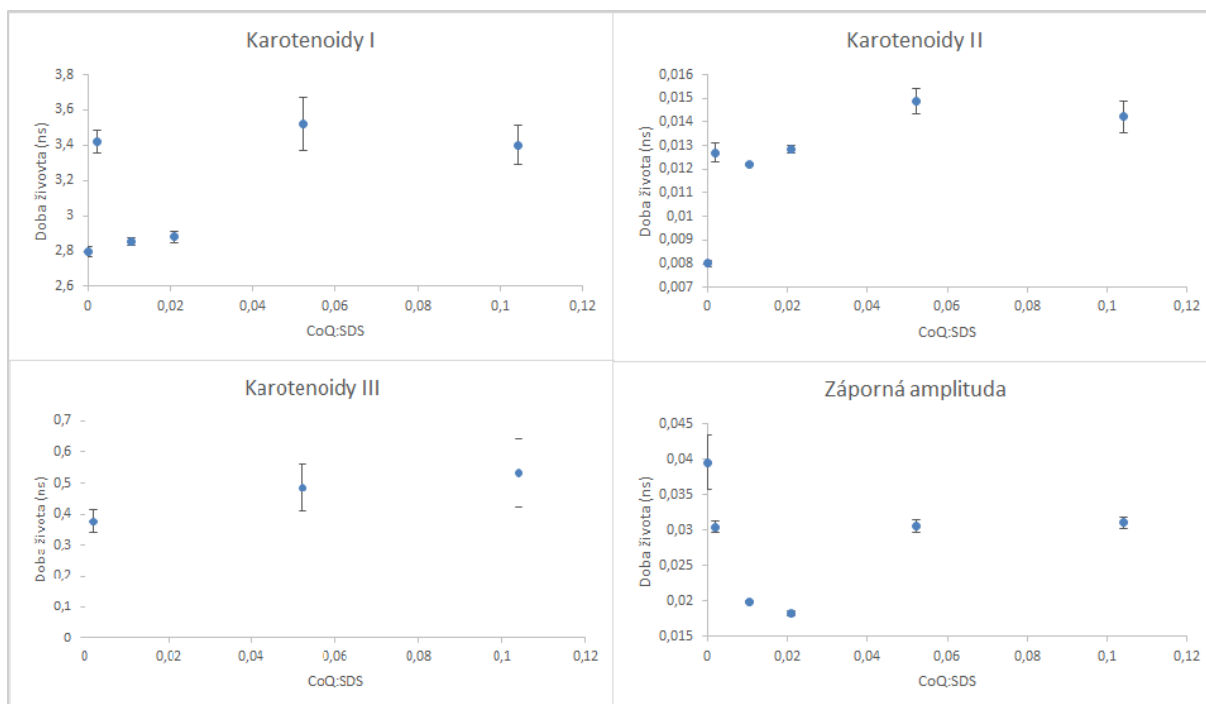
Doby života připadající na viskozitními efekty způsobenou zápornou amplitudu se, v souladu s teoretickými úvahami, příliš nemění.

V následujícím Graf 2 je pak přehled relativního zastoupení jednotlivých dob života, posuzované dle amplitud jednotlivých dob života a souhrnné amplitudy:



Graf 2: Relativní zastoupení dob života v micelárních systémech s ergosterolem

Nejvíce zastoupenou spící formou byla forma Karotenoidy II, jejichž relativní amplituda nepoklesla pod cca 75 %. To ukazuje na převládající hydrofobní distribuci karotenoidů uvnitř micel. Velmi důležitou dobou života z hlediska zastoupení v micelách je čas se zápornou amplitudou, ukazující na důležitost viskozitních efektů v micelách. Zastoupení záporné amplitudy vzrůstá s rostoucí koncentrací ergosterolu v micelách. Karotenoidy I a III jsou z hlediska zastoupení zcela marginální (< 0,2 %).



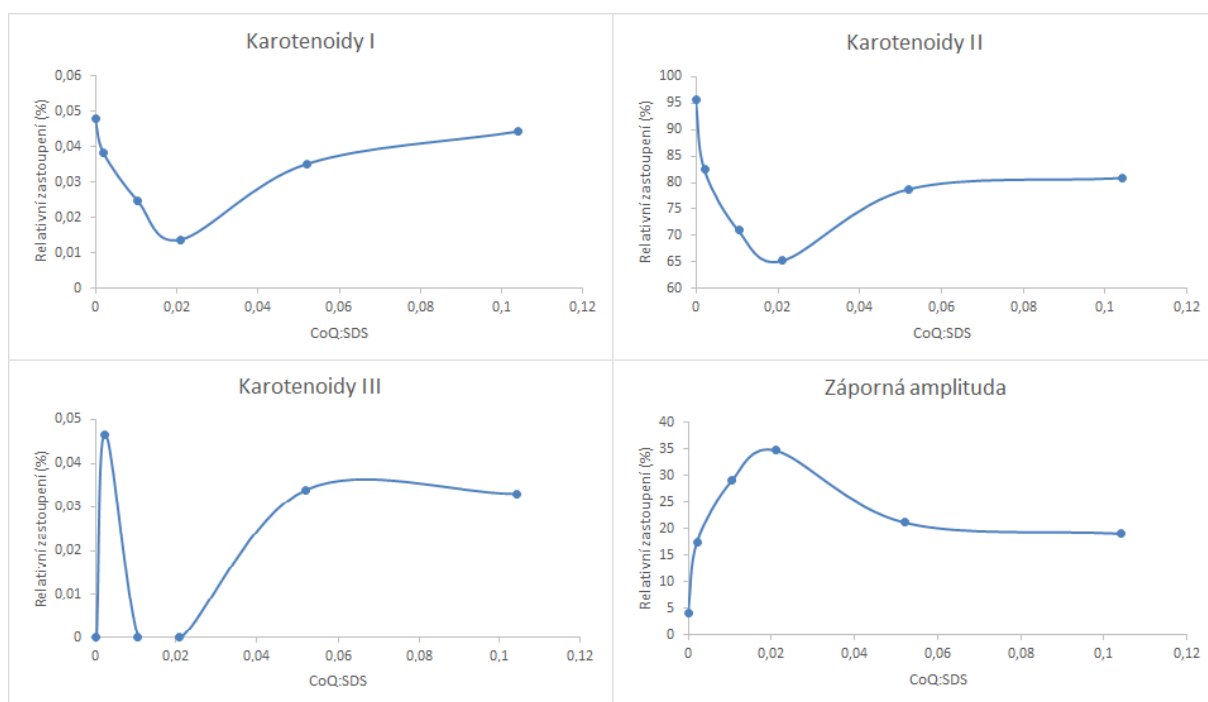
Graf 3: Doby života karotenoidů v micelách SDS:β-karoten:koenzym Q

Micelární systémy, které namísto ergosterolu obsahují koenzym Q10, vykazují obdobné chování s výjimkou Karotenoidů I a v případě doby života se z průběhu viděného u micel obsahujících ergosterol liší i záporná amplituda.

Karotenoidy I vykazují u micel obsahujících CoQ zpočátku jen pozvolný nárůst doby života s růstem koncentrace CoQ, resp. poměru CoQ:SDS, a až pak dojde k prudkému nárůstu a posléze stabilizaci doby života v rozmezí 3,4-3,6 ns. U micel s ergosterolem je nárůst prudký už při nízkých poměrech CoQ:SDS a stabilizovaná hladina je poněkud níže, 3,1-3,5 ns. CoQ tedy lépe stabilizuje excitovaný stav β-karotenu (příp. karotenoidů obecně), ovšem tento efekt se dostavuje se zvyšující se koncentrací jen zvolna (Graf 3).

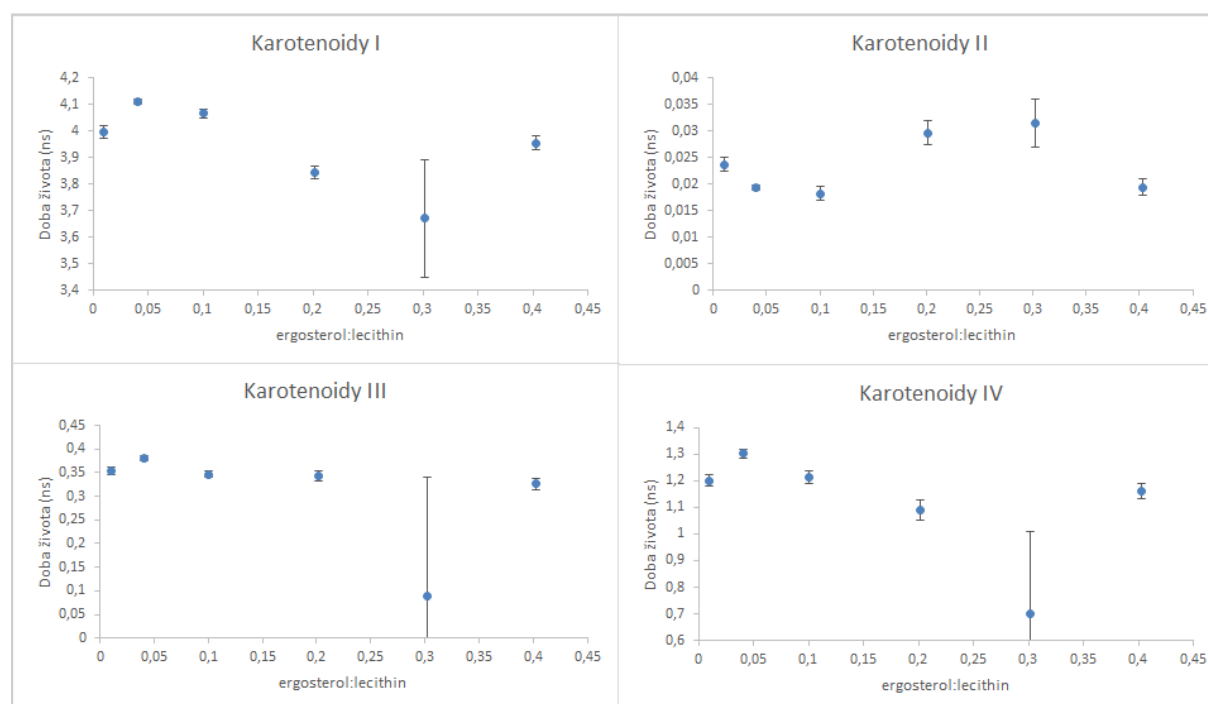
Nyní bude pozornost věnována lipozomům, vytvořeným jako systém tří složek β-karoten:ergosterol:lecithin a sloužícím jako model membránových systémů uvnitř buněk, příp. též cytoplazmatické membrány.

V lipozomech bylo možné nalézt čtyři formy karotenoidů (Graf 5). Membránová forma karotenoidy I zde vykazuje vyšší stabilizaci než u micel, doba života pro nižší koncentrace ergosterolu přesahovala 4 ns. Roztoková forma Karotenoidy II vykazuje při vyšších koncentracích ergosterolu mírné zvýšení doby života, ukazující na stabilizaci excitovaného stavu přítomným ergosterolem. Karotenoidy III opět vykazují velmi vyrovnané hodnoty doby života (0,3-0,4 ns). Vzhledem k stabilitě hodnoty doby života bez ohledu jak na vliv koncentrace látky omezující fluiditu, tak na modelový systém (shoda mezi lipozomy a micelami), je vhodné uvažovat, že se jedná o formu karotenoidů, která je v excitovaném stavu stabilizovaná převážně nějakým typem interních sil. Nabízí se možnost, že slabá stabilizace excitovaného stavu je způsobena vznikem dimerů karotenoidů, tuto myšlenku je ovšem nutné vhodnými experimenty ověřit. Pokud by se skutečně jednalo o dimerní formu, znamenalo by to, že se nemůže jednat o formu charakteristickou pro transportní váčky.



Graf 4: Relativní zastoupení dob života v micelách s koenzymem Q

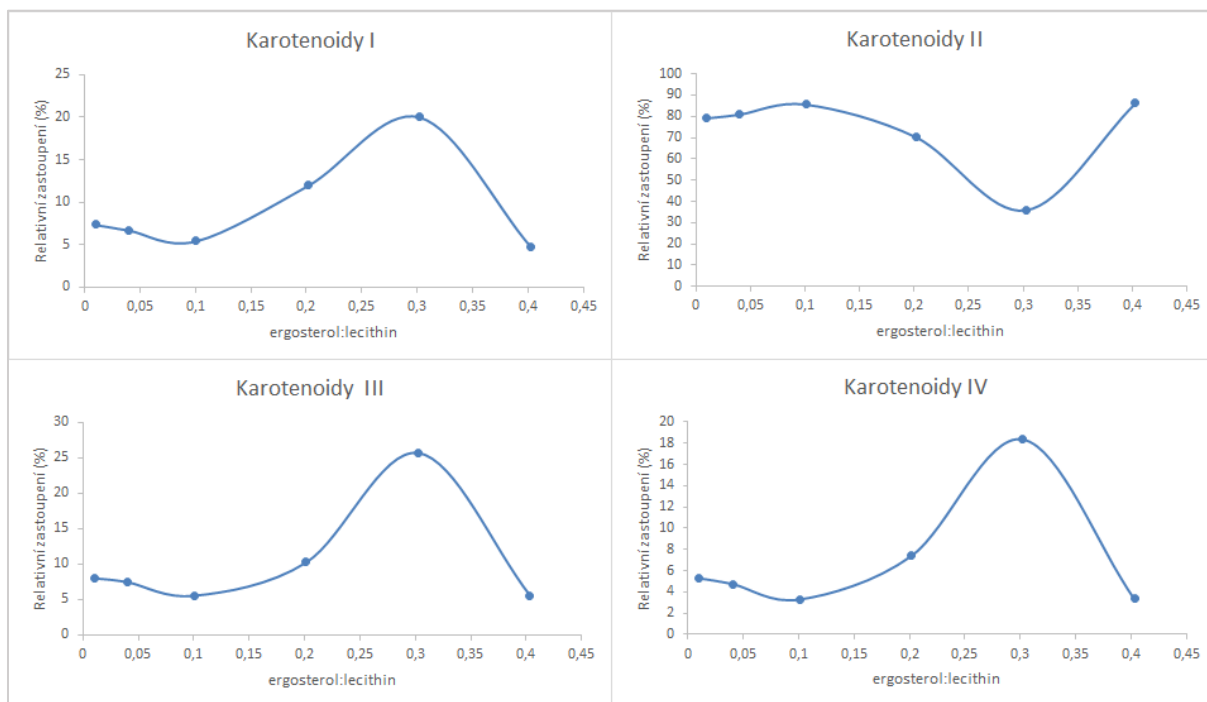
Karotenoidy IV je forma, která se v micelách neobjevila. Kromě lipozomů je možné se s ní setkat i v buňkách. Má ještě delší dobu života než Karotenoidy III a doba života je nepříliš proměnlivá, nabízí se tak úvaha o trimerní formě.



Graf 5: Vývoj dob života v lipozomech v závislosti na obsahu ergosterolu

Z hlediska relativních amplitud je zajímavé (Graf 6), že při poměru ergosterol:lecithin 0,3, tedy když připadá molekula ergosterolu přibližně na tři molekuly lecithinu, se výrazně snížil relativní obsah karotenoidů II (jinak dominující i navzdory lipozomům jakožto membránovým strukturám) a celkově se zastoupení jednotlivých forem vyrovnalo.

Pokles „roztokové“ formy II lze vysvětlit omezením fluidity lipozomálních membrán takovým, že do značné míry volně se pohybující a rotující karotenoidy II se v nich nemohou vyskytovat až na oblasti s nižším obsahem ergosterolu. Mění se tak do jiných forem. Vzestup amplitudy této formy a pokles u ostatních s dalším zvýšením koncentrace ergosterolu pak lze interpretovat jako projev vzniku klastrů („lipid rafts“), ve kterých je ergosterol zakonzentrován, zatímco mimo tyto rafty je membrána na ergosterol chudší a tedy více fluidní; umožňuje tak vyšší výskyt formy karotenoidy II.



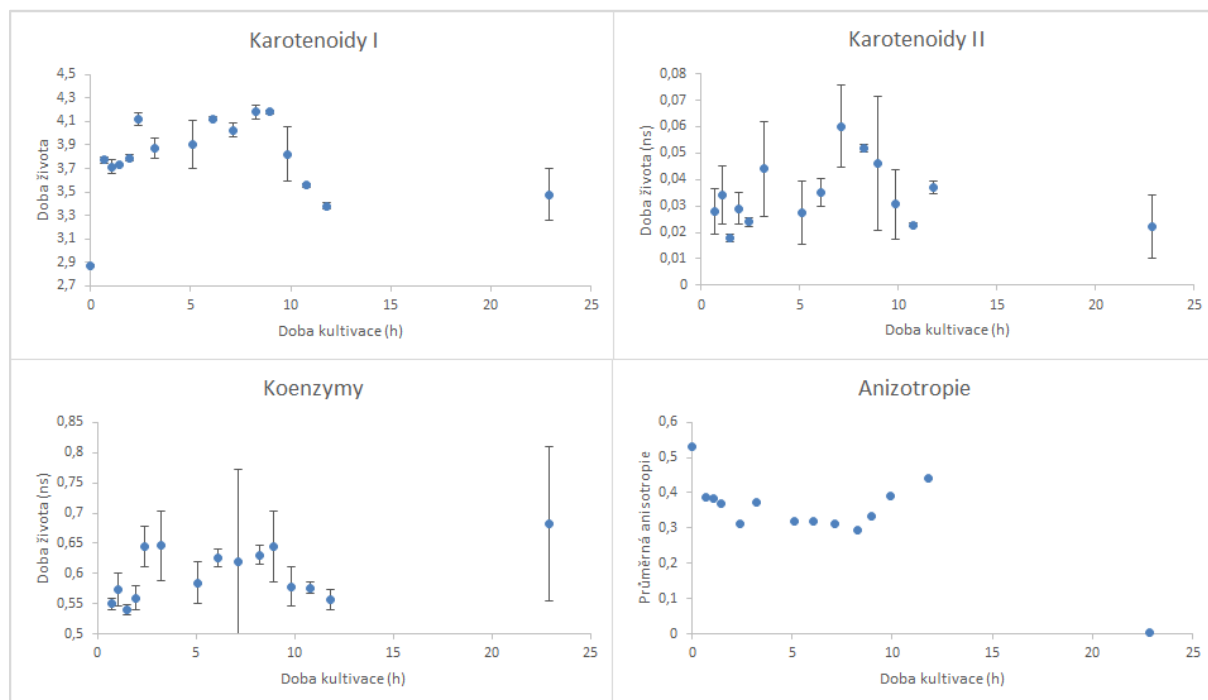
Graf 6: Relativní zastoupení jednotlivých dob života v lipozomech v závislosti na množství ergosterolu

5.2 Kultivace v průtokové komoře s průtokem média

Další experimenty byly provedeny již na živých systémech – s buňkami kvasinek druhu *Cystofilobasidium capitatum* CCY 10-1-2, dle postupu uvedeného v kap. 4.5 Experiment s průtokem tekutého provzdušňovaného média byl zaměřen na studium vývoje přítomnosti karotenoidů s jednotlivými dobami života s vývojem kultury (po dobu 24 hodin). S každým vzorkem také byla měřena úhrnná anizotropie fluorescence (Graf 7). Pro membránovou formu karotenoidy I lze pozorovat postupný vzestup doby života během prvních devíti hodin (od 3,7 do 4,1 ns), ukazující na postupné zvyšování rigidity membrán vedoucí ke stabilizaci excitovaného stavu karotenoidů. S tím zjevně souvisí i postupný pokles anizotropie fluorescence karotenoidů, ukazující na struktury s nižší možností pohybu (rotačního i translačního) molekul. Na něco podobného, i když s větší mírou nejistoty (viz chybové úsečky v Graf 7), lze poukázat i v případě formy v LB – karotenoidy II. U koenzymů dojde ke skokové změně doby života cca ve třetí hodině (z 0,55 na 0,65 ns), přičemž zvýšená hodnota zůstává až do deváté hodiny.

Vzhledem k pozorovanému pomalému růstu kvasinek v těchto podmínkách, resp. neočekávaně dlouhé lag fázi, lze konstatovat, že postupné zvyšování rigidity membrán může souviset s přizpůsobováním se, resp. uzavíráním se nepříznivému prostředí (obrana vůči vlivům prostředí). Vzestup (průměrné) doby života koenzymů ukazuje na vyšší zastoupení

oxidované formy (NAD a NADP, viz kap. 2.7.3) a tedy vychýlení poměru NAD(P)/NAD(P)H ve prospěch oxidované formy. To znamená nastavení metabolismu buněk na oxidativní (katabolické) procesy za účelem získání energie. Vzhledem k pozorované lag fázi se jedná o energii potřebnou k udržení životních funkcí buněk.

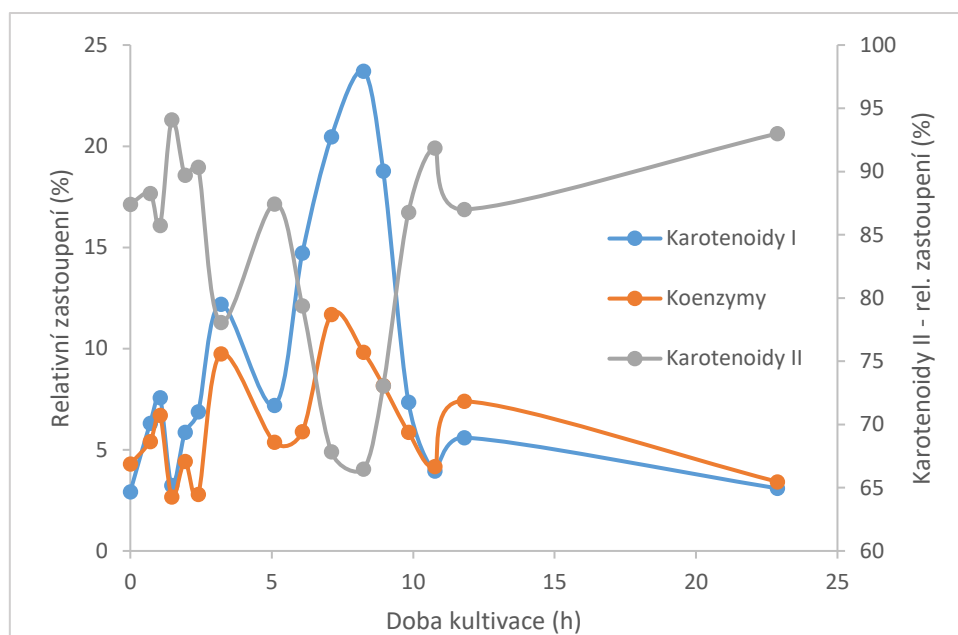


Graf 7: Vývoj dob života v průběhu kultivace s průtokem média komorou a celková anizotropie

Po deváté hodině dochází k vzestupu anizotropie a poklesu všech dob života – tedy ke snížení organizovanosti a rigidity struktur, v nichž jsou karotenoidy vnořeny. K této změně dochází s přechodem z lag fáze do časně exponenciální fáze. Zároveň se snižují doby života koenzymů, což ukazuje na vyšší zastoupení redukované formy (tj. NAD(P)H), typické pro převažující biosyntetické reakce, které se uvádějí do chodu, když se buňka začíná připravovat na dělení.

Relativní zastoupení jednotlivých dob života (Graf 8) ukazuje na dominantní postavení formy přítomné v granulích – Karotenoidy II. Její podíl klesal během lag fáze až k 65 %, poté opět vzrostl až nad 90 %. Relativní zastoupení dob života membránové formy Karotenoidy I vykazuje přesně opačný trend. Během přechodu do exponenciální fáze jsou tedy karotenoidy staženy z membrány do LB – membrány se tak zprůchodňují a jsou prostupnější pro jednotlivé složky media.

Zastoupení koenzymů je, v souladu s očekávanými plynoucími z úvahy o konstantním poolu těchto molekul v buňce, vyrovnané v průběhu celé doby kultivace.



Graf 8: Relativní zastoupení dob života fluorescence v buňkách v průběhu kultivace v průtokové komoře. Na vedlejší ose je vyneseno relativní zastoupení granulární formy karotenoidů (Karotenoidy II)

5.3 Kultivace v průtokové komoře na pevném médiu

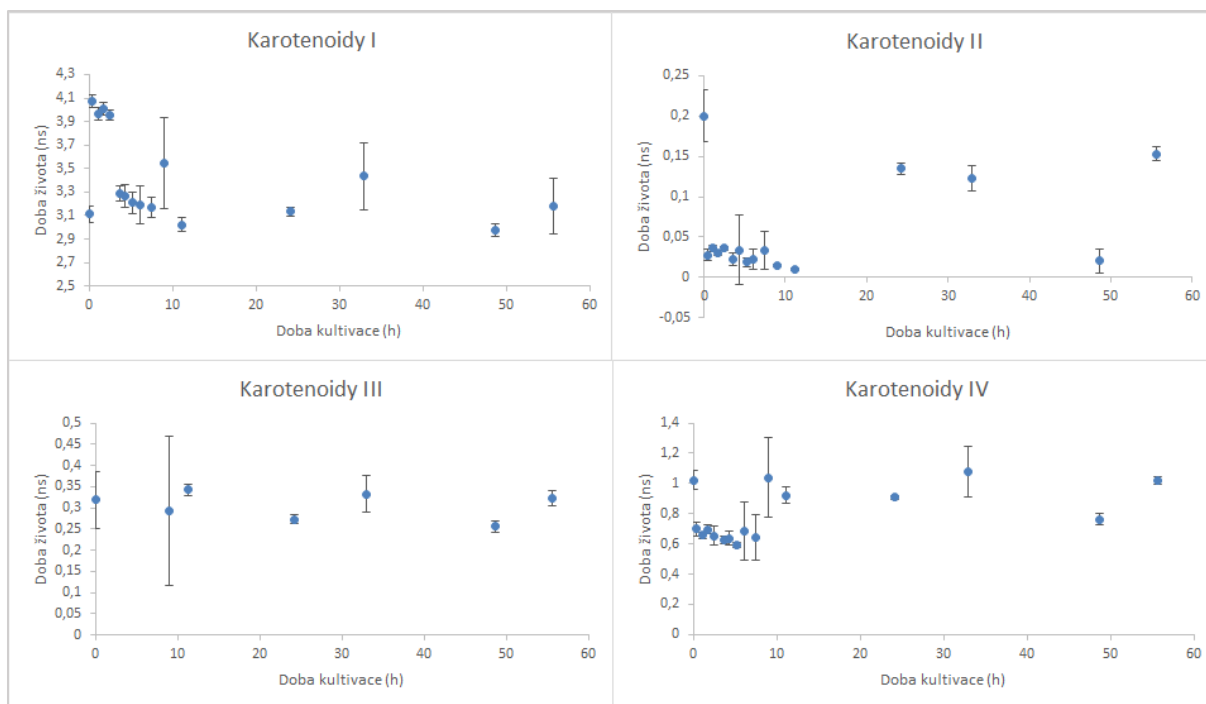
Experiment, ve kterém byl do průtokové komory vložen plátek živného agaru, byl analogem předcházejícího experimentu, ovšem bez průtoku živného média. Buňky rostly na pevné živné půdě. Byl sledován vývoj dob života i vývoj zastoupení jednotlivých specií karotenoidů. Během tohoto experimentu byly v buňkách nalezeny všechny čtyři doby života karotenoidů nalezené u modelových systémů (Graf 9).

Z vývoje dob života lze vidět, že lag fáze byla zřejmě krátká – čas „membránové“ formy Karotenoidy I podstupuje náhlý propad v hodnotě doby života mezi 2,5-3h kultivace. Pokles pokračuje až do cca 10. hodiny, poté se hodnota doby života této formy karotenoidů víceméně stabilizuje v rozmezí 3-3,1 ns, zřejmě se vstupem buněk do rané stacionární fáze. Maxima hodnot na konci lag fáze jsou mezi experimentem s průtokem média a tímto experimentem v podstatě shodná, okolo hodnoty 4,1 ns.

Pokles doby života Karotenoidů II ukazuje na postupnou větší „volnost“ molekul karotenoidů v lipidických granulích v průběhu fáze růstu. Ta je ve stacionární fázi vystřídána dosti rigidními strukturami granulí ($\tau > 100$ ps).

Karotenoidy III i zde vykazují v podstatě konstantní dobu života, což nasvědčuje pro zcela specifickou formu, např. dimery (viz výše).

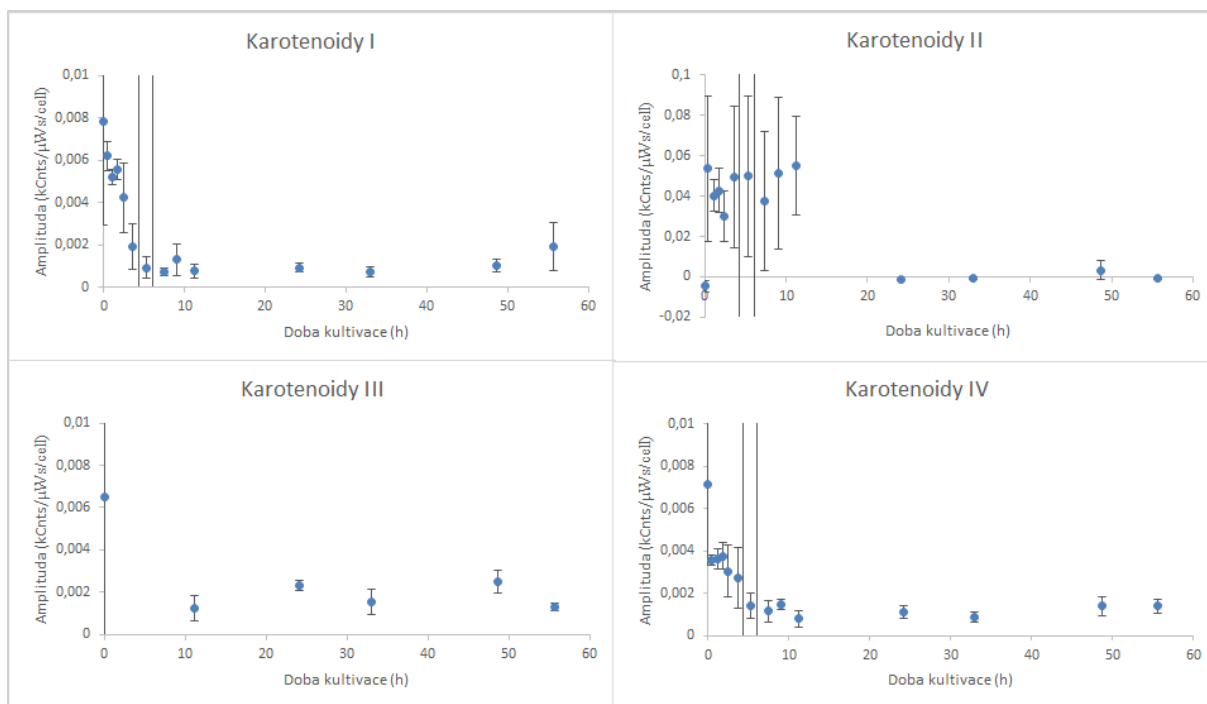
Karotenoidy IV v níže uvedeném grafu jsou vlastně směsí času koenzymů (prvních 8 hodin) a karotenoidů IV typu. Tato „lipozomální“ forma, resp. forma trimerní, se v buňkách objevila s příchodem stacionární fáze a ukazuje na významné zvýšení koncentrace karotenoidů. Vzhledem k současnému výskytu v lipozomech a v buňkách v oblastech cytoplazmatické membrány a endoplasmatického retikula lze usoudit, že se jedná o zvýšení koncentrace karotenoidů v omezeném prostoru, který skýtá membránová dvojvrstva. Za takových podmínek si lze snadno představit asociaci molekul vedoucí ke vzniku dimerních a trimerních forem.



Graf 9: Vývoj dob života v průběhu kultivace na pevném médiu

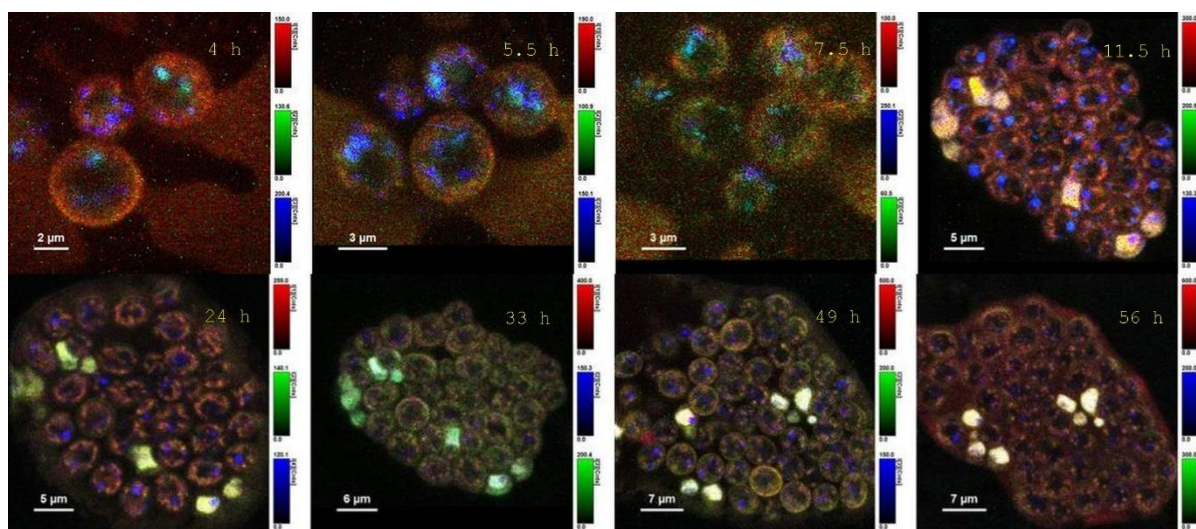
U tohoto experimentu byly řádně změřeny i amplitudy, což umožňuje vzájemné porovnání jejich absolutních hodnot jak mezi jednotlivými měřeními tohoto experimentu, tak mezi různými experimenty. Změřené amplitudy jsou vztaženy na celkovou dodanou světelnou energii použitou pro pořízení snímku (součin výkonu laseru a doby snímkování) a zároveň na počet buněk na snímku zachycených tak, aby údaj amplitudy byl vyjádřen na jednotku energie ($\mu\text{W}\cdot\text{s}$) a jednu buňku (Graf 10).

U karotenoidů I lze v prvních pěti hodinách pozorovat pokles amplitudy připadající na jednu buňku, z toho lze vyvozovat pokles koncentrace karotenoidů v membránách. V následných hodinách je stabilní hladina až do konce měření (poslední hodnota se vzhledem k velikosti směrodatné odchylky od předcházejících hodnot neliší). Granulární forma karotenoidy II sice vykazuje ve fázi růstu poměrně vysoké hodnoty, ovšem zatížené velkou chybou, což poukazuje na vysokou variabilitu mezi jednotlivými buňkami. Co je oproti submerzním kultivacím výjimečné, je nízké zastoupení karotenoidů v lipidických granulích ve stacionární fázi, což lze pozorovat i na Obrázek 14 níže, kde se buňky ve stacionární fázi jeví neobvykle „prázdné“ a fluorescenci karotenoidů lze vidět jen v cytoplasmatických membránách a oblastech přilehlých.

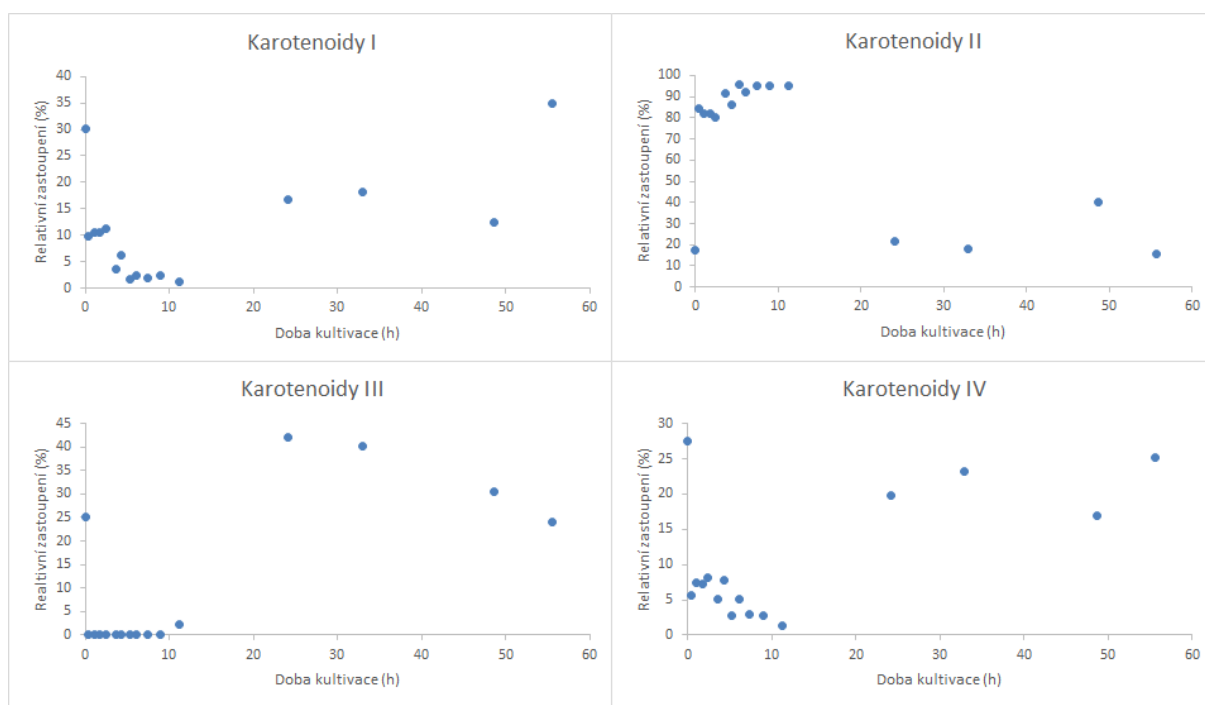


Graf 10: Vývoj amplitud (a tedy i vnitrobuněčných koncentrací) v průběhu fermentace na pevném médiu

Relativní zastoupení jednotlivých specií karotenoidů je uvedeno v Graf 11 níže. V průběhu růstu dominuje v buňkách forma přítomná v granulích (Karotenoidy II). Ve stacionární fázi je podíl této formy menšinový (okolo 20%), nejvýznamnější příspěvek tvoří Karotenoidy III, ovšem její relativní zastoupení v čase postupně klesá, především ve prospěch vyšších relativních zastoupení forem I a IV.



Obrázek 14: Vývoj kultury na pevném médiu pozorovaný prostřednictvím FLIM. Použita false-colour representation: červená – membránové Karotenoidy I, zelená – koenzymy, modrá – Karotenoidy II v lipidických granulích



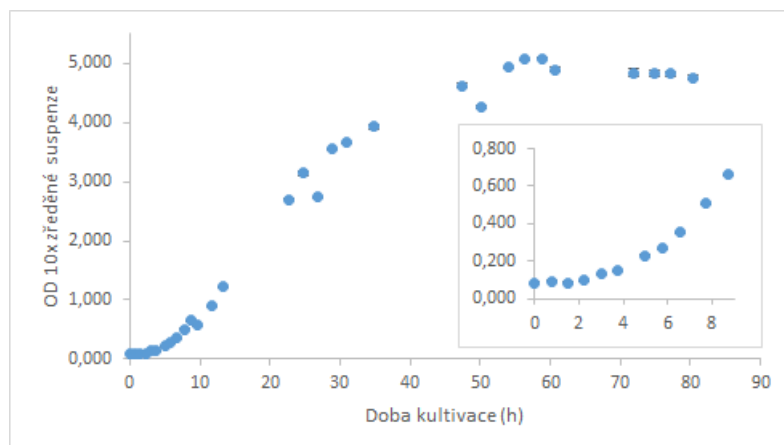
Graf 11: Relativní zastoupení jednotlivých dob života při kultivaci na pevném médiu

Lze tedy shrnout, že při kultivaci na povrchu pevného živného média jsou ve stacionární fázi karotenoidy přednostně lokalizovány do membrán a přilehlých vnitrobuněčných prostor. To je podstatný rozdíl oproti experimentu v tekutém médiu, kde podíl forem karotenoidů typických pro LB dosahoval ve stacionární fázi až 90 a více procent. Lze vyslovit domněnku, že karotenoidy v membránách tvoří obranný systém chránící buňky před oxidačními vlivy – při kultivaci na povrchu pevného média jsou totiž buňky a jejich kolonie ve značném kontaktu s okolním vzduchem.

5.4 Kultivace *Cystofilobasidium capitatum* ve zkumavkách

V dalších experimentech byla kultivace kvasinek *C. capitatum* přenesena do větších objemů v souladu s postupem uvedeným v kapitole 4.6. Na Graf 12 je uvedena růstová křivka získaná měření OD v průběhu kultivace ve zkumavkách. Lze vidět, že dobře zaočkovaný a vedený experiment může být provázen nízkou variabilitou kultury mezi jednotlivými zkumavkami, navzdory jejich množství, které zvyšuje pravděpodobnost „outliers“ – kultur výrazně odlišných svým charakterem, způsobených např. chybou při homogenizaci inokula či při pipetování.

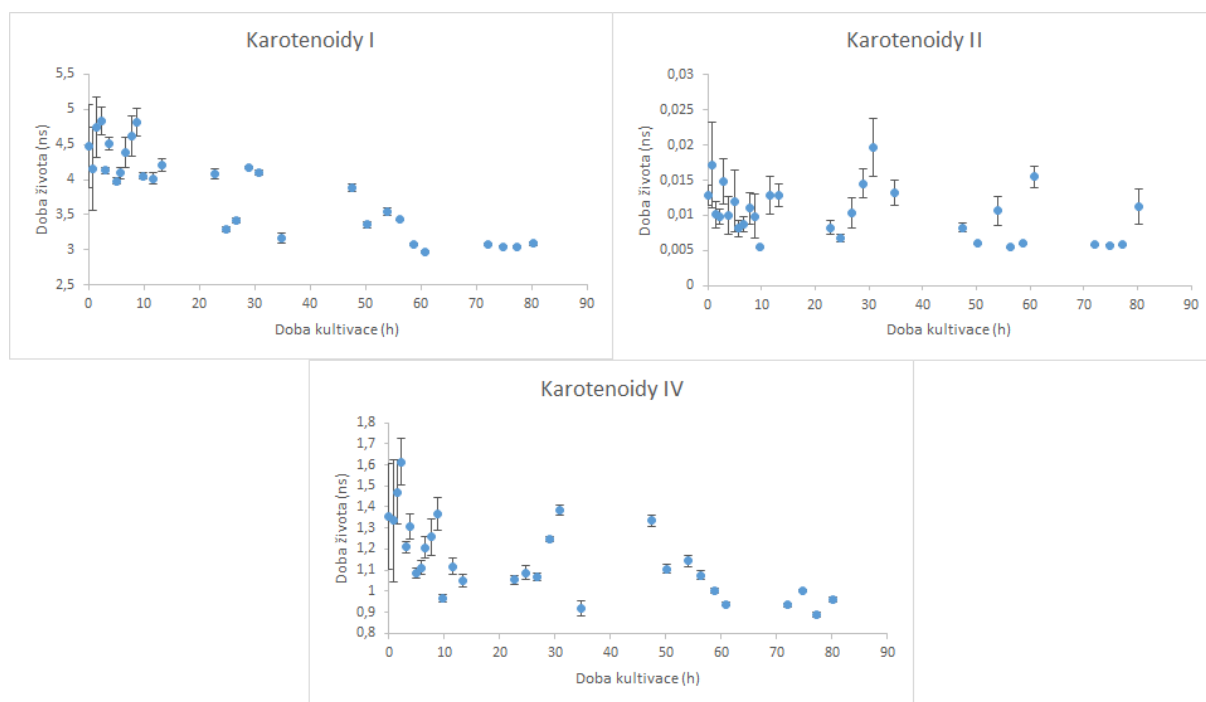
Na růstové křivce lze pozorovat několik přechodů, prvním je konec lag fáze zhruba okolo 2 h, kdy se začíná zvyšovat OD. Další přechod nastává zhruba v rozmezí 25-28 h a souvisí zřejmě s přechodem kultury do stacionární fáze, resp. její části charakteristické akumulací zásobních látek (triacylglycerolů). Poslední přechod nastal mezi 56-58 h a po něm začalo klesat OD. Souvisí pravděpodobně s poklesem glukózy v médiu na takovou hladinu, že bylo spuštěno odbourávání zásobních látek, které přirozeně vede ke snížení rozptylových vlastností buněk a tedy ke snížení OD. Bude zajímavé pozorovat, zdali se tyto přechody nějak projeví na vlastnostech vnitrobuněčného prostředí (s vlivem na dobu života karotenoidů), distribuci karotenoidů (relativní zastoupení jednotlivých forem) a jejich koncentraci (amplituda/buňku).



Graf 12: Graf optické hustoty buněčných suspenzí kvasinek vyvíjejících se paralelně ve zkumavkách

Na Graf 13 níže je zastižen vývoj dob života jednotlivých forem karotenoidů, tak jak byl zachycen při experimentu ve zkumavkách. Byly standardně nalezeny formy I a II, forma III ovšem chyběla, ale byla přítomna forma IV. Autofluorescence buněk způsobená koenzymy byla potlačena, ze záznamů o experimentu ani ze snímků není zřejmé čím.

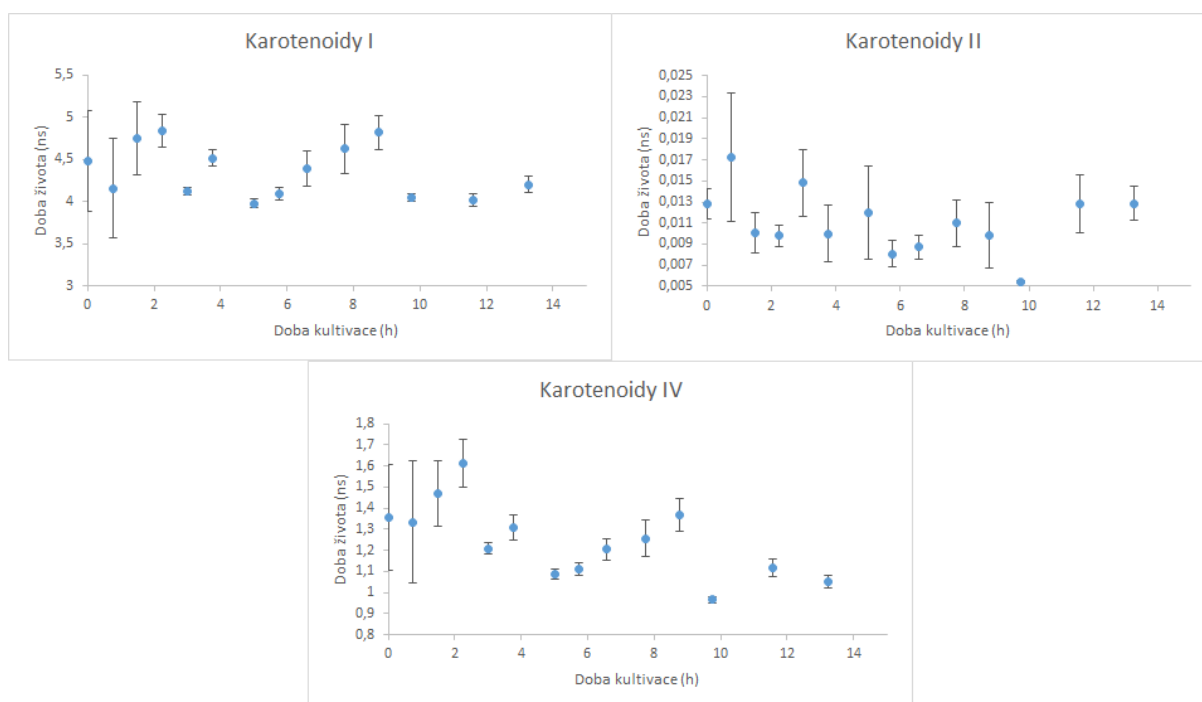
Karotenoidy I překvapují vysokou hodnotou doby života na počátku kultivace – 4,1-4,6 ns oproti 3,7 a 4,1 ns u experimentů v průtokové komoře. Zde nutno uvažovat rozdílný vliv inokula a především zacházení s ním. Při zaočkování do průtokové komory byla vnášena kultura ze zásobní Petriho misky, zatímco do zkumavek bylo vnášeno inokulum v tekutém médiu z Erlenmeyerovy baňky, která byla v průběhu zaočkování více než třiceti zkumavek opakovaně žíhaná v plameni kahanu a po celou dobu držena v jeho blízkosti, takže došlo k podstatnému zahřátí buněčné suspenze. Vzrůst rigidity membrán indikovaný vyšší dobou života Karotenoidů I tak může být reakcí buněk na tepelný šok, ke kterému došlo během procesu přenosu kultury do čerstvého média ve zkumavkách.



Graf 13: Vývoj dob života v průběhu kultivace ve zkumavkách

Další vývoj Karotenoidů I ukazuje stabilní hodnotu okolo 4 ns mezi 10-48 h, poté následuje pokles doby života této membránové formy na 3 ns, což ukazuje na nižší stabilizaci excitovaného stavu karotenoidů v membránách, tedy pravděpodobně i nižší schopnost se bránit oxidačnímu stresu. Alternativně či doplňkově lze tvrdit, že membrány v tomto období budou mít vyšší fluiditu, tedy i propustnost. Vzhledem k tomu, že pokles doby života je ukončen po posledním přechodu na růstové křivce, kdy zřejmě dochází ke spotřebovávání zásobních lipidů, lze tyto změny v membránách považovat za související s hladověním a snad i do určité míry poškozením buněk.

Poslední změny, které lze na profilu Karotenoidů I vypožorovat, jsou změny související s lag fází a exponenciální fází (viz Graf 14). V druhé hodině, kdy na růstové křivce výše uvedené lze pozorovat konec lag fáze, lze vidět přibližný počátek poklesu doby života membránové formy karotenoidů. Tedy lze vidět, že s počátkem množení buněk souvisí rozvolnění rigidity membrány, které lze dokonce snadno kvantifikovat, byť zatím nepřímou prostřednictvím doby života karotenoidů. Zmíněný pokles doby života končí okolo 5-6 h, kdy hodnota doby života Karotenoidů I opět začíná stoupat. Jestli lze na křivce OD – růstové křivce něco v té době vypožorovat, tak je to nápadné zrychlení růstu (zvýšení směrnice). V té době zřejmě začala vlastní exponenciální fáze, do té doby probíhala tzv. fáze zrychleného růstu. Vzestup doby života v tomto období vývoje kultury je zvláštní a důvod v tuto chvíli zůstává nejasný. O to více je zvláštní tím, že v 10 h dochází k poklesu doby života na hodnotu okolo 4 ns, která se udržuje do zhruba 48 h (resp. 30 h, poté zřejmě nastává pozvolný pokles). V souvislosti s 30 h je nutné zmínit další přechod na růstové křivce, kdy dochází ke změně směrnice – poklesu rychlosti nárůstu OD, což indikuje přechod do stacionární fáze. Ten je tedy zřejmě spjat s pomalým poklesem rigidity membrány u *Cystofilobasidium capitatum* v tekutém médiu. To je v rozporu s očekáváním, podle něž membrány „zatuhnou a znepropustní se“, aby byla buňka lépe chráněna [80; 81; 82].



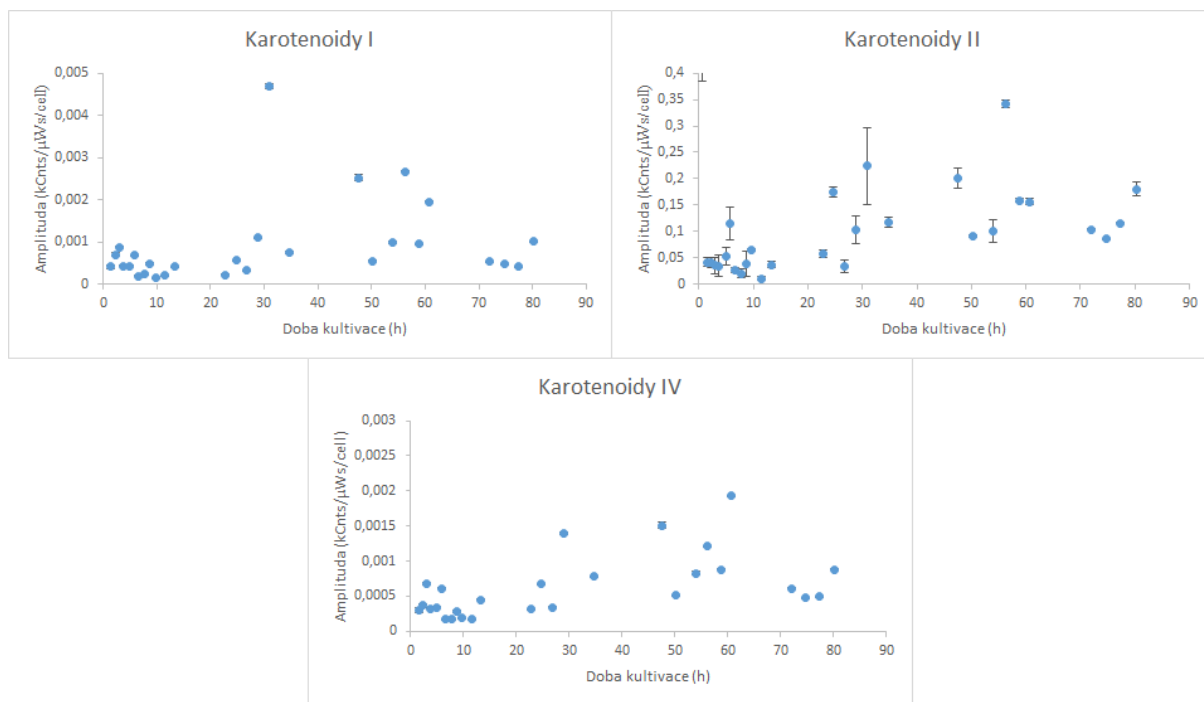
Graf 14: Detail vývoje dob života v prvních hodinách kultivace ve zkumavkách

Zbývající dvě spíce, Karotenoidy II i IV vykazují sobě podobné změny v časovém profilu změn dob života (Graf 14). Výjimkou je počátek kultivace, kdy se forma IV ve svém časovém průběhu podobá formě I, zatímco forma II (granulární, molekuly ve volném „roztoku“) se vyznačuje prostým (a vzhledem k směrodatným odchylkám ne úplně jistým) poklesem doby života. Vezmeme-li v úvahu chybovost stanovení této doby života u jednotlivých měření – tedy doby života, která je poblíž limitu přístroje – pak je možné, že Karotenoidy II, a tedy i lipidické granule v prvních 12 hodinách neprocházely zásadnějšími změnami. To je ovšem nepravděpodobné, spíše lze očekávat, že procesy spojené s aktivací proteosyntetického a replikačního aparátu povedou k určité míře mobilizace energetických rezerv. Dává tedy smysl, že do cca 7 h dochází k poklesu doby života této formy a posléze k její stabilizaci, jinými slovy dochází k rozvolnění (a zpřístupnění) struktury lipidických granulí, jejichž materiál tak může být snáze dostupný intracelulárním lipázám a esterázám.

Provázanost I. a IV. formy bylo možné vidět už při kultivaci na pevném povrchu, kdy ve stacionární fázi se karotenoidy hromadily v membránách (forma I) a v přilehlých oblastech cytoplazmy (forma IV).

Po zbytek kultivace jsou profily II. a IV. formy obdobné. Před 30. hodinou u obou dochází k náhlému vzestupu doby života, což zjevně souvisí s přechodem do stacionární (resp. akumulační) fáze. Zvláštní je, že tento prudký vzestup hodnot doby života střídá pozvolný pokles zpět na původní hodnoty, v případě formy IV pozvolnější (60 h) než u formy II (již 50. hodina). V tuto chvíli jako nejrozměšší interpretace se jeví spojitost s dalším vyčerpáváním živin v médiu a tedy s přechodem do hlubší stacionární fáze (dle OD zhruba okolo 58. hodiny), kdy dochází ke spotřebovávání zásobních látek. Aby buňka přežila, je nucena aktivizovat své energetické a materiálové rezervy, což se projeví zpřístupněním a rozvolněním struktur sloužících k uchovávání rezerv, tj. povede to ke snížení doby života karotenoidů přítomných v těchto strukturách, což bylo pozorováno (Graf 14).

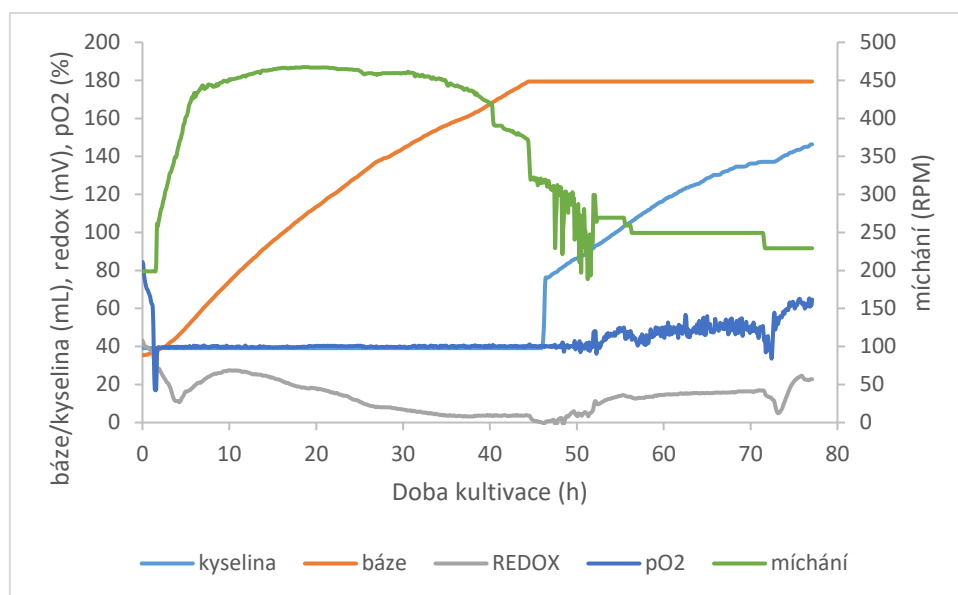
Pohled na vývoj amplitud, odpovídající vývoji vnitrobuněčné koncentrace jednotlivých specií, je zachycen na Graf 15 níže. V průběhu fáze zrychleného růstu lze pozorovat pokles koncentrace jednotlivých forem, v exponenciální fázi jsou koncentrace do určité míry stabilizovány, ale s vyčerpáváním zdrojů přichází po 20. hodině postupný nárůst koncentrace. S dalším vyčerpáváním živin po 50. hodině kultivace lze vidět i pokles obsahu karotenoidů v buňkách.



Graf 15: Vývoj amplitud v průběhu zkumavkové kultivace

5.5 Fermentorová kultivace *Cystofilobasidium capitatum*

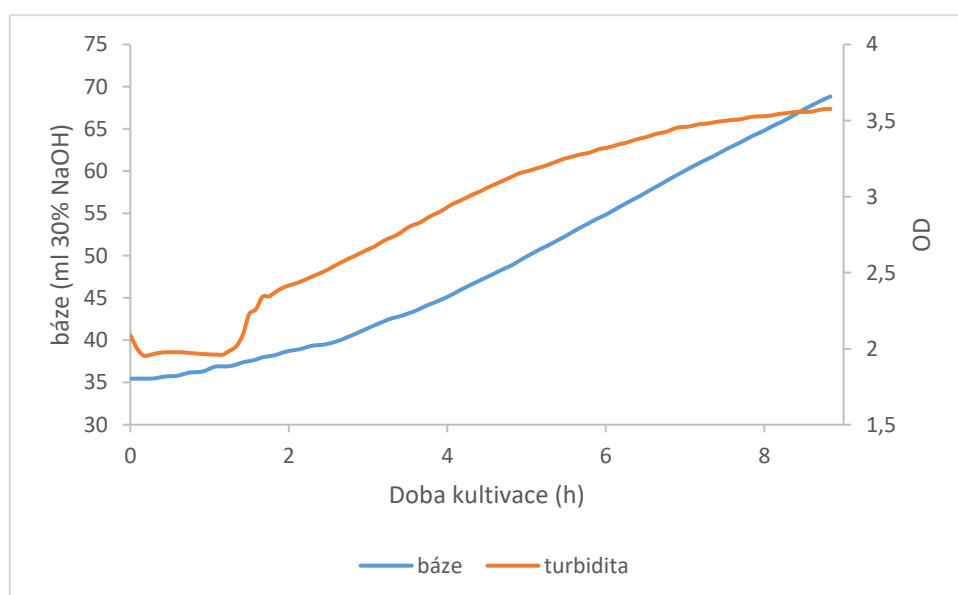
V další fázi práce byla kultivace modelového testovacího kmene kvasinky *C. capitatum* převedena do většího objemu laboratorního fermentoru dle postupů uvedených v kap. 4.7. Na Graf 16 je vystižen průběh jednotlivých parametrů měřených on-line v rámci fermentorového systému. Lze vidět, že v čase 1,41 h došlo k poklesu pO_2 takovému, že z původního minima otáček (200 RPM) došlo k prudkému vzestupu. Zde zřejmě skončila lag fáze. Skutečnost, že tomu bylo takto záhy, ukazuje na dobrou kondici inokulační kultury. Po 7 h naopak dochází ke stabilizaci otáček na hladině okolo 450 RPM (nastavený horní limit otáček byl 800 RPM). V 45 h dochází k zastavení spotřeby báze, v 46 h dochází ke skokovému zahájení spotřeby kyseliny. Velmi zajímavý je průběh redoxního potenciálu v médiu, proto mu budou dále věnovány samostatné grafy (Graf 18 a Graf 19) a komentář.



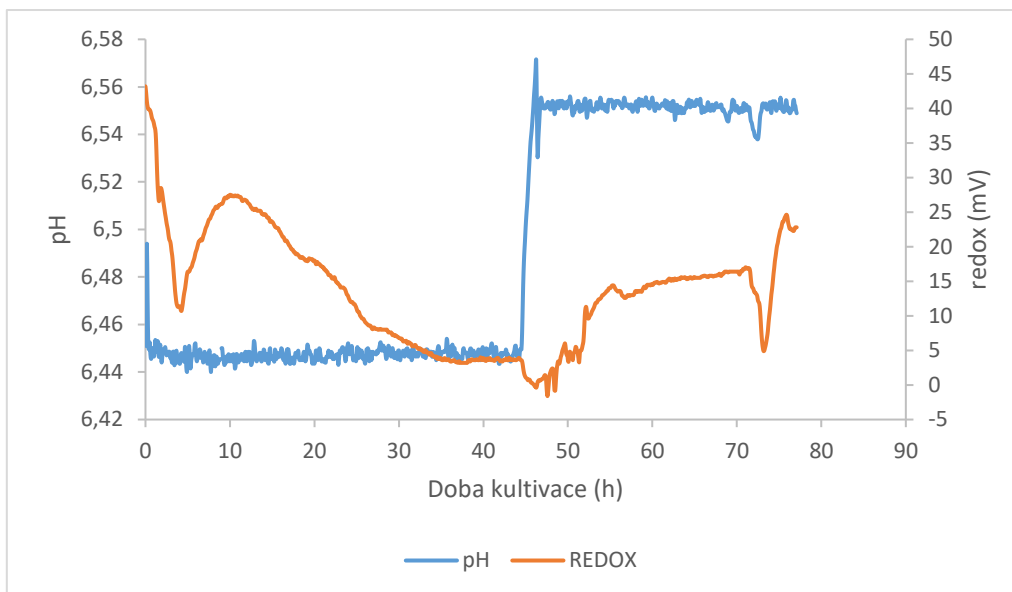
Graf 16: Vývoj on-line měřených parametrů při kultivaci *C. capitatum* ve fermentoru

Na následujícím grafu (Graf 17) je přiblížen průběh spotřeby báze a turbidity v prvních devíti hodinách. Po malém počátečním poklesu se turbidita v průběhu lag fáze stabilizovala, po 1,20 h však dochází ke skokovému nárůstu, který je dále následován již plynulým růstem turbidity. Po 8 h je už přírůstek turbidity marginální.

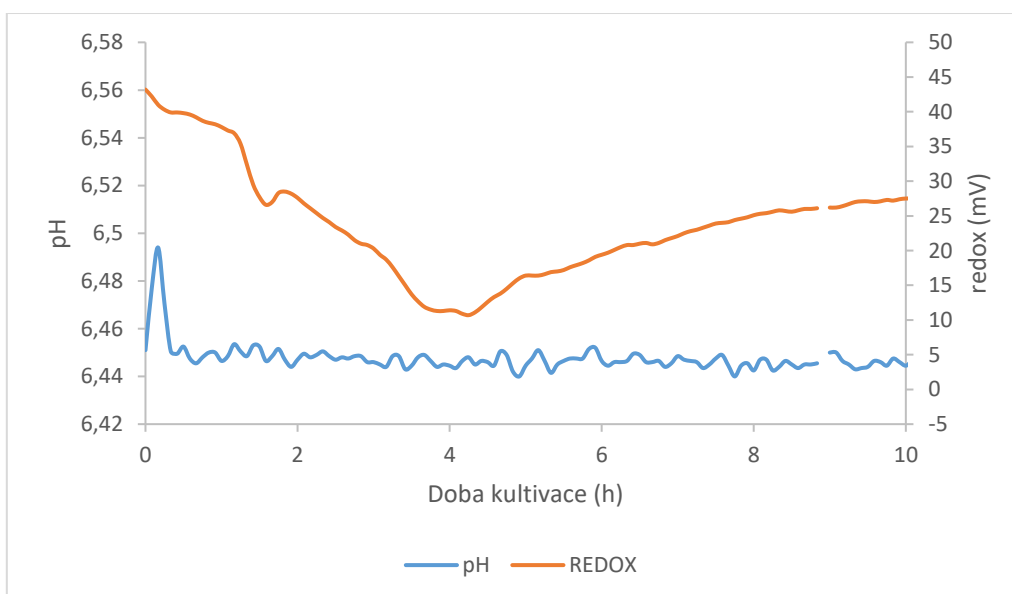
Níže na Graf 18 a Graf 19 je vystižen průběh redoxního potenciálu média a pH média, v případě Graf 19 se jedná o detail prvních deseti hodin. Lze vidět, že v době, kdy dle výše uvedeného došlo k ukončení lag fáze, je na křivce redoxního potenciálu vidět zlom – prudký pokles. Zvláštní je změna v průběhu redoxního potenciálu okolo čtvrté hodiny, kdy opět začal stoupat.



Graf 17: Vývoj turbidity a spotřeby báze v prvních hodinách kultivace



Graf 18: Průběh redoxního potenciálu a pH média

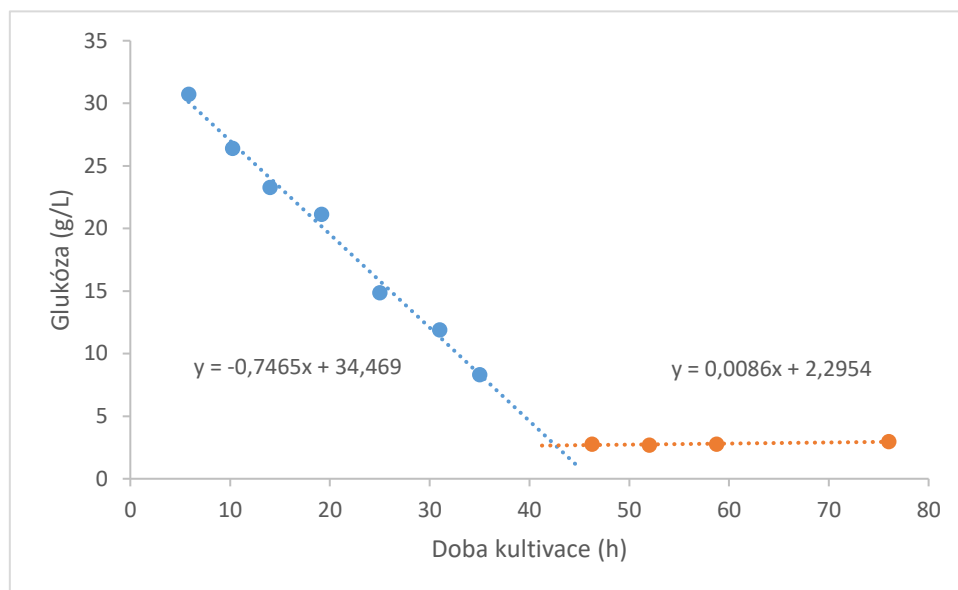


Graf 19: Vývoj redoxního potenciálu a pH – detail prvních hodin kultivace

Po desáté hodině se redoxní potenciál vyznačuje pozvolným poklesem, který se mění až před 46 h, kdy došlo k zahájení spotřeby kyseliny a přesunu pH na horní mez regulovaného intervalu (viz kap. 4.7). Tyto změny budou ještě dále diskutovány v souvislosti s dalšími měřenými parametry.

Stanovení koncentrace reziduálních cukrů, s předpokladem, že se jedná dominantně o glukózu, která byla do živného média přidána, ukazuje na dva odlišné a ve svém průběhu více méně lineární režimy (viz Graf 20). První režim představuje lineární spotřebu glukózy v průběhu fermentace, druhý režim je charakteristický vcelku vyrovnanou spotřebou kultury při určité reziduální koncentraci glukózy v médiu (zhruba 2,3 g/L). Průsečík dvou přímek a tedy přibližný čas přechodu mezi těmito dvěma režimy je asi v 42,6 h. K tomuto jevu došlo v průběhu druhé noci fermentace, kdy nebyly odebírány vzorky, tedy není možné průběh koncentrace cukrů v médiu zpřesnit. Lze ovšem očekávat, že přechod byl pozvolný a spíše

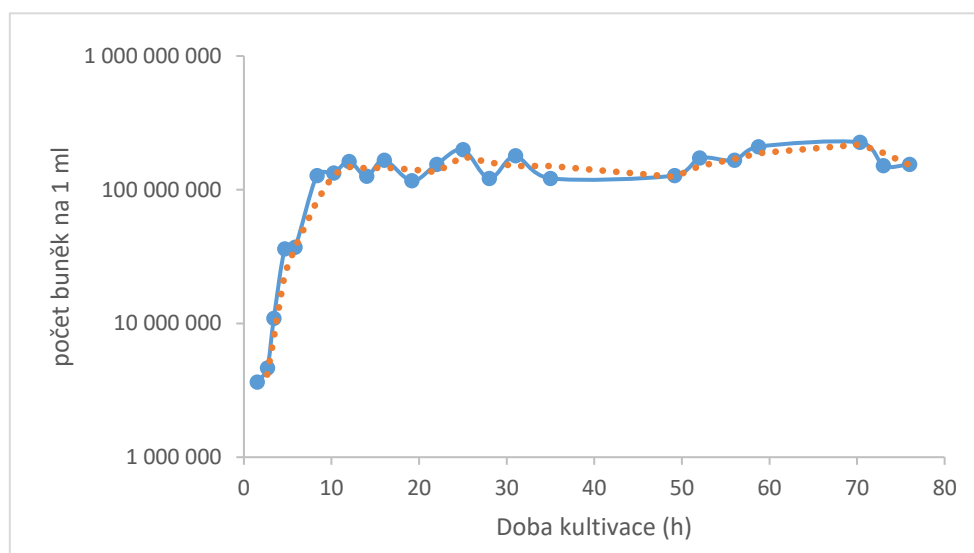
nastal zhruba okolo 45.- 46. hodiny, tedy v době mezi ustáním spotřeby báze a počátkem spotřeby kyseliny.



Graf 20: Spotřeba glukózy v průběhu kultivace *C. capitatum*

5.5.1 Využití průtokové cytometrie ke sledování průběhu fermentace *C. capitatum*

Cílem následujících experimentů bylo ověřit, zda je metoda průtokové cytometrie vhodná k rychlému monitoringu průběhu biotechnologického procesu. Experimenty byly provedeny v souladu s postupem uvedeným v kap. 4.9. V následujících grafech a doprovodných komentářích jsou uvedeny informace obdržené analýzami vzorků na průtokovém cytometru a také souvislosti s výše uvedenými informacemi o událostech (např. přechodech, zlomech na křivkách) v průběhu kultivace.



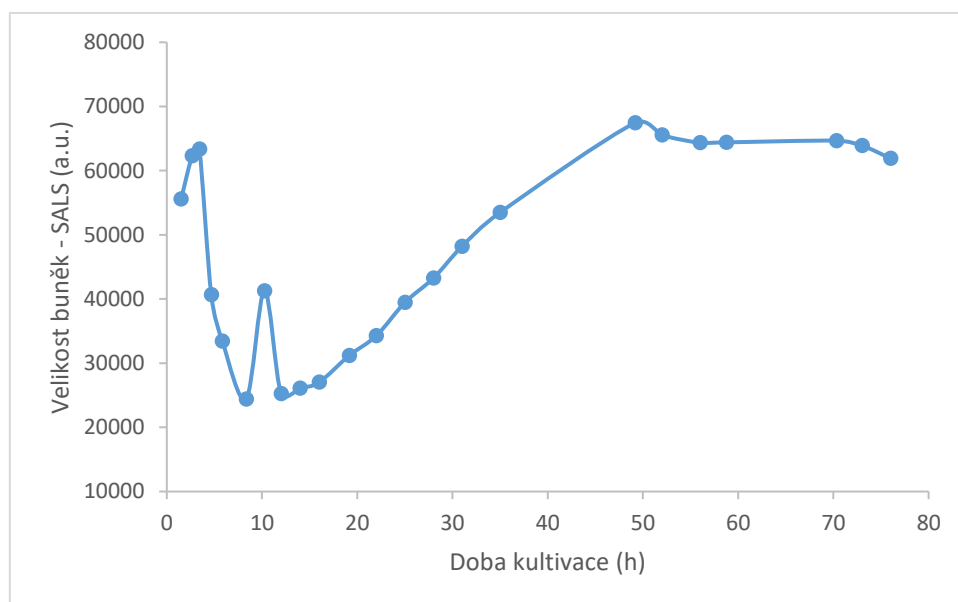
Graf 21: Vývoj počtu buněk v průběhu kultivace *C. capitatum*, získaný pomocí průtokové cytometrie

Na Graf 21 lze vidět, že ke stabilizaci počtu buněk došlo již v 9 h, tak časný konec exponenciální fáze lze snadno vysvětlit nízkou koncentrací použitého uhlíkatého zdroje – jen

30 g/L glukózy. Ovšem navzdory nízkému množství dodaného substrátu – od 43 h se kultura dokonce pohybuje na reziduální koncentraci asi 2,3 g/L glukózy (viz Graf 21 a předchozí text) – až do konce kultivace v 76 h počet buněk jen nevýznamně kolísá a nebylo zaznamenáno žádné odumírání.

Na Graf 22 je vystižen vývoj velikosti kvasničných buněk v průběhu kultivace. Velikost buněk je vystižena pomocí střední hodnoty parametru SALS pro buněčnou populaci v daném vzorku. SALS značí tzv. „small angle light scattering“, rozptyl světla měřený v malém úhlu vůči procházejícímu paprsku. Použité jednotky jsou arbitrární a odpovídají tzv. „channel number“ při daném nastavení přístroje.

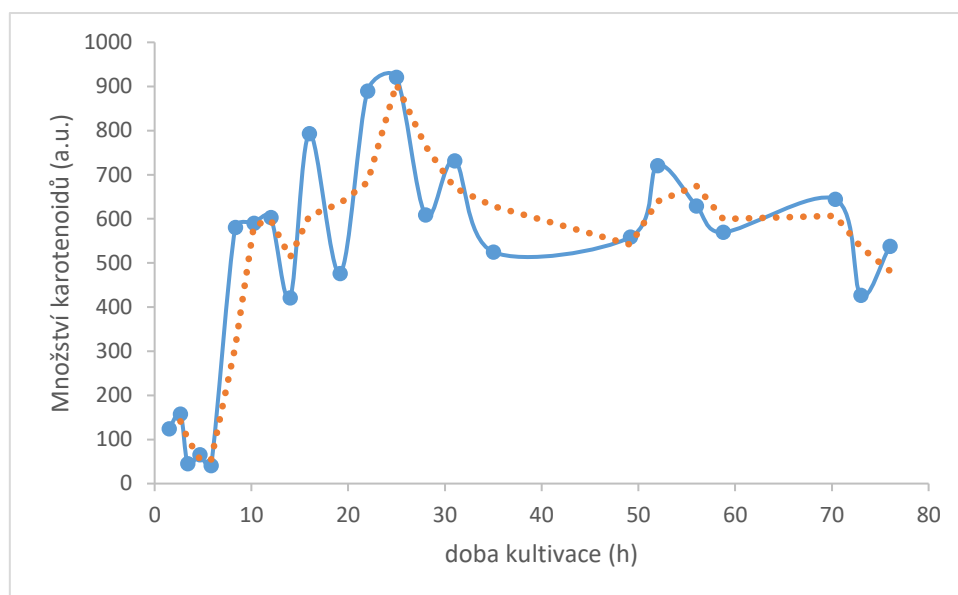
Po krátkém počátečním vzestupu velikosti, kdy v populaci převládaly pučící buňky, dochází po 3,5 h k prudkému poklesu velikosti buněk, dané odtržením pupenů – malých kulatých buněk. Není dosud zřejmé, zdali hodnota v 10. hodině není zatížena chybou měření. Nicméně po desáté hodině dochází k postupnému navyšování velikosti buněk, což, jak bude později ukázáno, jednoznačně souvisí s akumulací lipidů ve vnitrobuněčných prostorách. Naopak po 50 h dochází k pozvolnému poklesu velikosti buněk, souvisejícímu s konzumací zásobních lipidů a přizpůsobování objemu buňky nové vnitrobuněčné koncentraci těchto látek.



Graf 22: Změny velikosti buněk, posuzované dle rozptylu světla v přímém směru při průtokové cytometrii

Na níže uvedeném Graf 23 je uveden časový profil množství karotenoidů, přičemž toto množství bylo odhadnuto na základě střední hodnoty autofluorescence buněk při 590 nm (opět s jednotkami „channel number“ při daném nastavení) a množství buněk:

$$\text{Karotenoidy} = \frac{\text{počet buněk za analýzu} \times \langle \text{AFL590} \rangle}{10^6} \quad (1.)$$



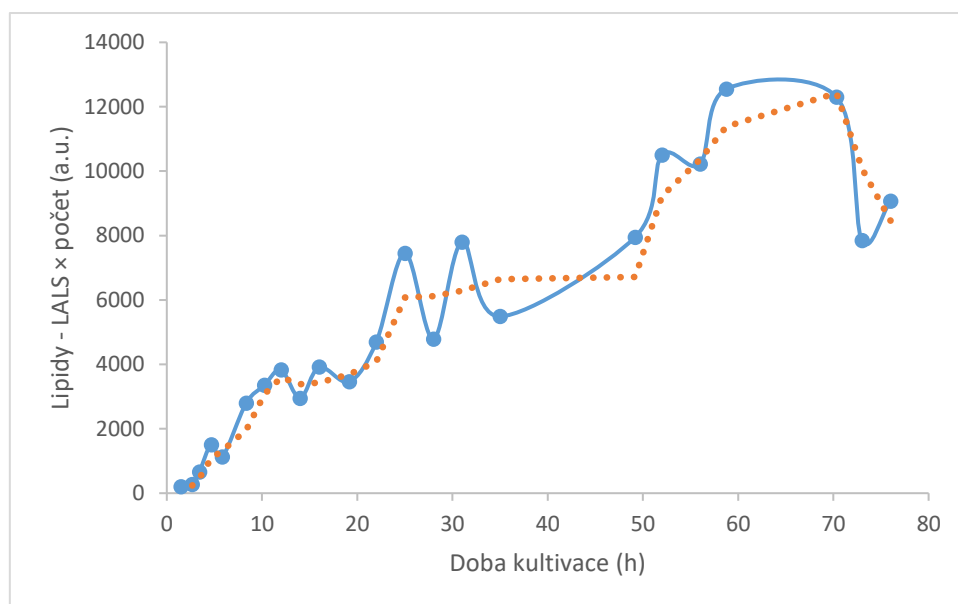
Graf 23: Množství karotenoidů dle autofluorescence buněk při 590 nm

Lze vidět, že po 6 h prudce vzrostlo množství karotenoidů, tedy poté, co ustal prudký vzestup míchání, které se pak přibližně stabilizovalo na hodnotách okolo 450 RPM. To ukazuje, že navzdory tomu, že množení buněk ještě dále pokračovalo až do zhruba 10 h, okolo 6 h došlo k metabolické změně, která vedla ke snížené potřebě kyslíku (pokles rychlosti změny míchání) a zároveň k produkci karotenoidů. Množství karotenoidů dle průtokové cytometrie stoupalo zhruba do 25 h, poté pokleslo a bylo přibližně konstantní až do konce kultivace.

Pro lipidy (resp. triacylglyceroly) lze získat obdobná vyhodnocení hned dvěma způsoby: 1) za využití rozptylu světla na intracelulárních granulích lipidů, konkrétně s využitím střední hodnoty LALS (large angle light scattering), rozptylu světla měřeného ve velkém úhlu vůči procházejícímu paprsku; 2) s využitím fluorescence (střední hodnoty „channel number“ při 590 nm) Nilské červeně v lipidických granulích po obarvení buněk.

Na následujícím grafu (Graf 24) je zmíněné vyjádření-potenciálního obsahu lipidů pomocí rozptylu světla. Množství lipidů bylo vypočteno analogicky jako u karotenoidů (viz rovnice 1), jen místo střední hodnoty autofluorescence je zde použita střední hodnota bočního rozptylu světla:

$$\text{Lipidy} = \frac{\text{počet buněk za analýzu} \times \langle \text{LALS} \rangle}{10^6}$$



Graf 24: Množství lipidů dle bočního rozptylu světla a počtu buněk

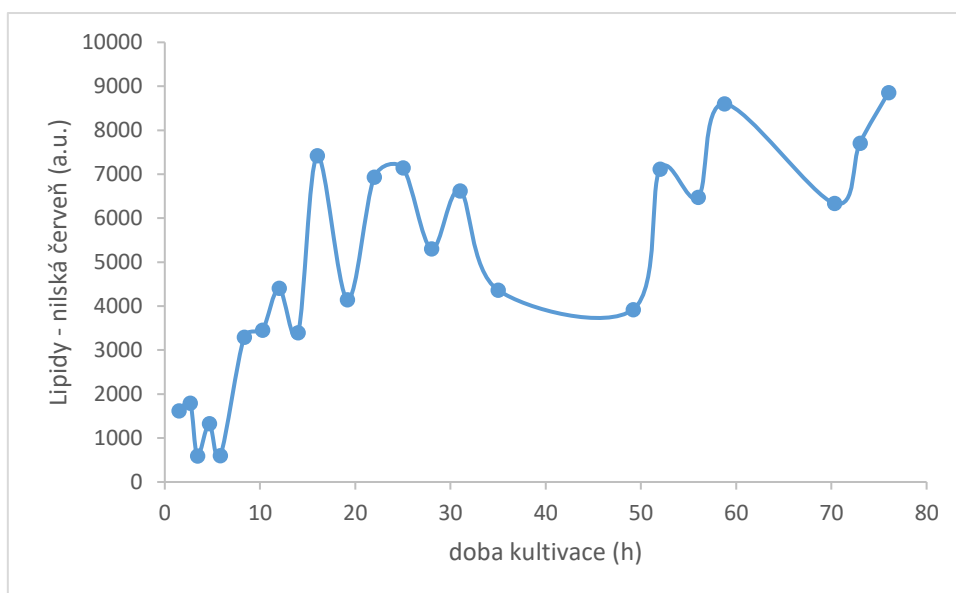
Dle tohoto grafu lze vidět vzestup obsahu lipidů až do asi 60 h, poté množství stagnuje, až klesá.

Dále je uveden graf pro obsah lipidů získaný pomocí měření fluorescence buněk barvených Nilskou červení (Graf 25). Hodnoty byly opět získány analogickým výpočtem za použití střední hodnoty fluorescence nilské červeně při 590 nm, s korekcí na autofluorescenci:

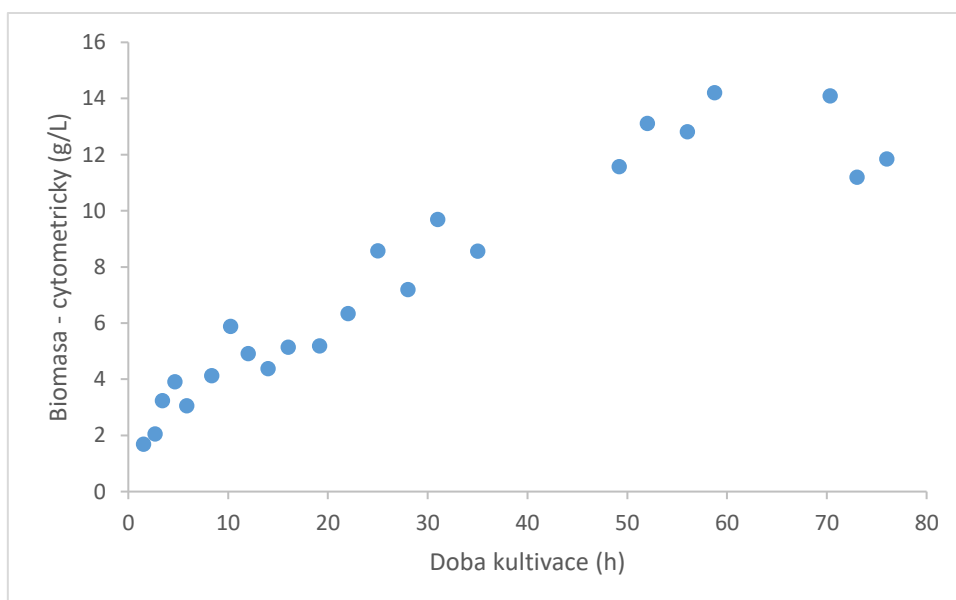
$$\text{Lipidy} = \frac{\text{počet buněk za analýzu} \times (\langle \text{NR590} \rangle - \langle \text{AFL590} \rangle)}{10^6}$$

Ze srovnání obou grafů lze vidět, že dle měření rozptylu mělo být prvního maxima obsahu lipidů dosaženo mezi 20-30 h, poté měl následovat pokles a stagnace až do 50 h – to je ovšem při měření pomocí Nilské červeně značně odlišné (Graf 25). Po 50 h se množství lipidů vrací k hodnotám, které byly mezi 20-30 hodinou a v podstatě jsou vyrovnané až do konce kultivace.

Závěrem je uvedeno množství biomasy vyhodnocené pomocí průtokové cytometrie (viz kap. 4.9). To bohužel v případě fermentorové kultivace *C. capitatum* nebylo stanovováno gravimetricky, v Graf 26 jsou uvedeny odhady získané z průtokově-cytometrických dat pomocí kalibračního vztahu naměřeného pro příbuzný druh stejného rodu - *C. macerans* (uvedeno v sekci 5.6.1).



Graf 25: Graf množství lipidů podle fluorescence Nilské červeně



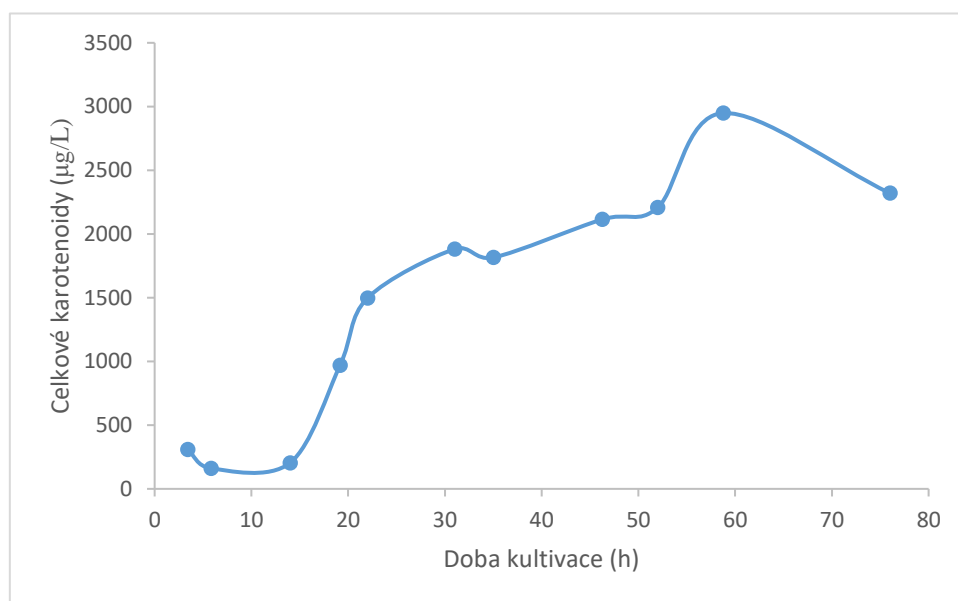
Graf 26: Odhad množství biomasy v průběhu kultivace. Odhad získán z průtokově cytometrických dat výpočtem pomocí kalibračního vztahu uvedeného v sekci 5.6.1

5.5.2 Stanovení karotenoidů pomocí HPLC, stanovení mastných kyselin pomocí GC a porovnání s časovými profily získanými pomocí průtokového cytometru

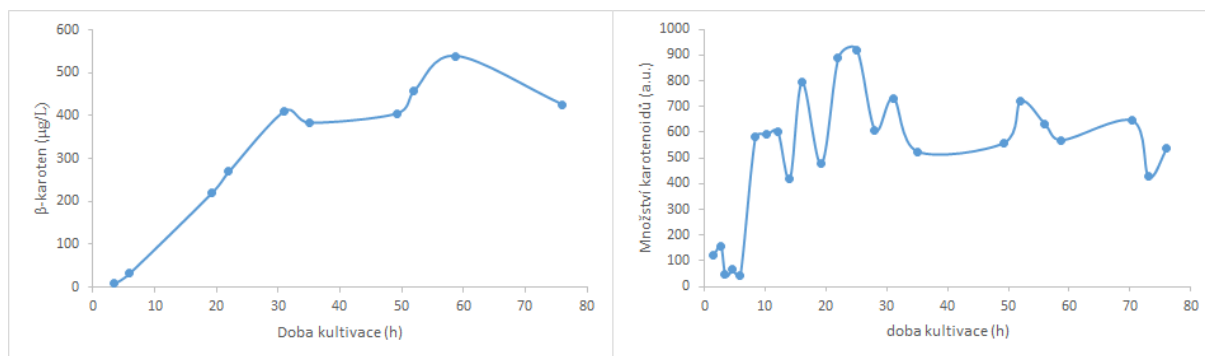
Stanovení metabolických parametrů v průběhu fermentorové kultivace *C.capitatum* bylo provedeno dle postupů uvedených v kap. 4.11 4.12 4.13 Pro celkové karotenoidy stanovené pomocí HPLC byla získána následující závislost (Graf 27) – po 14 h byla velmi silně zahájena syntéza karotenoidů, okolo 20 h syntéza podstatně zpomalila, a trvala více méně nezměněnou rychlostí až do konce kultivace. Vzorek z 58,75 h je přitom uvažován jako pravděpodobně odlehlá hodnota v důsledku problémů při extrakci. Je zřejmé, že průběh změn koncentrace karotenoidů v tomto grafu jen stěží může být srovnáván s tím, co je popsáno výše u výsledků průtokové cytometrie (Graf 23). Předběžně to vypadá, že metoda využívající průtokový cytometr zřejmě vystihuje množství β -karotenu v kvasinkách (viz srovnání Graf 28). Nelze si

nepovšimnout, že množství β -karotenu nápadně koreluje s celkovým množstvím karotenoidů, i když jeho relativní zastoupení je pouhých 20% oproti celkovému množství karotenoidů.

Nutno uvést, jakým způsobem jsou vztaženy hodnoty obsahu karotenů. Zatímco u HPLC stanovení je zřejmé, že se jedná o vyjádření na litr kultury, u průtokové cytometrie je situace na první pohled složitější. Je brána průměrná hodnota autofluorescence, jenž má odpovídat průměrnému obsahu karotenoidů v buňce. Tato hodnota je následně násobena počtem buněk v jednotkovém objemu kultury (viz rovnice 1). Tímto součinem dostáváme vyjádření množství karotenoidů v jednotkovém objemu, srovnatelné se stanovením pomocí HPLC.



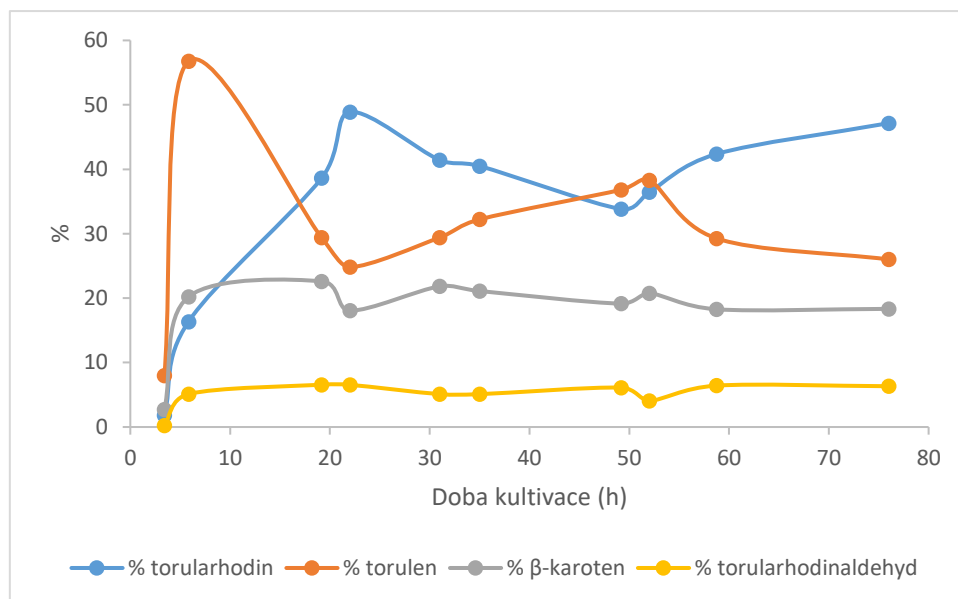
Graf 27: Množství karotenoidů stanovené po Folchově extrakci pomocí HPLC



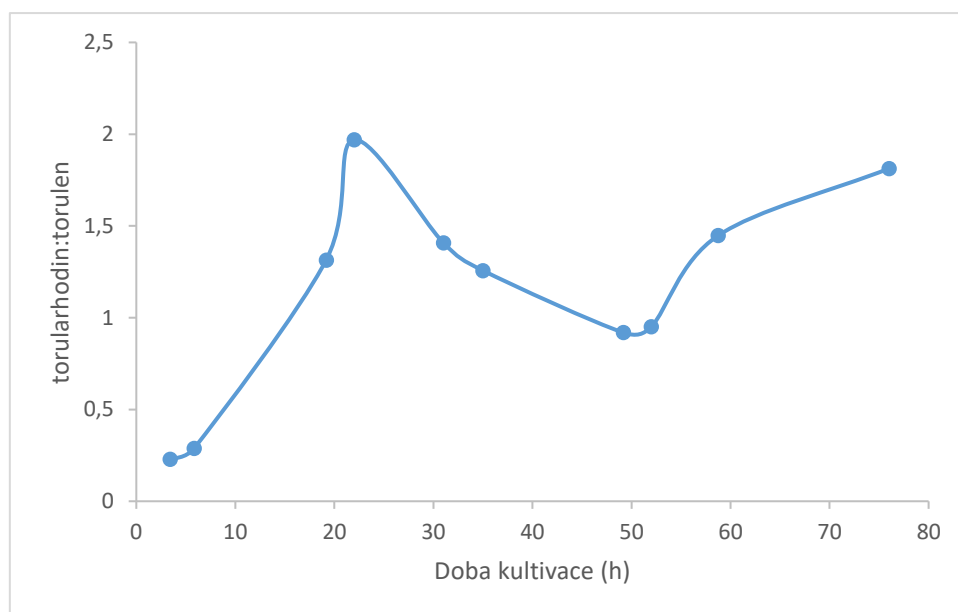
Graf 28: porovnání vývoje množství β -karotenu (HPLC) a odhadu karotenoidů z autofluorescence při 590 nm.

Co se týče zastoupení jednotlivých hlavních karotenoidů v průběhu kultivace, je zobrazeno níže na Graf 29. Lze vidět, že zastoupení torularhodinaldehydu a β -karotenu je napříč celou kultivací *C. capitatum* je v podstatě konstantní. Zato poměr torulenu a torularhodinu se mění, nicméně oba karotenoidy oscilují okolo hodnoty zhruba 35 %. Do 30 h, tedy v průběhu nárůstu množství karotenoidů, roste zastoupení torularhodinu, zatímco množství torulenu klesá (až dvojnásobný rozdíl, viz Graf 30), poté se zastoupení dorovnávají (zhruba 50 h). Ovšem potom, s dalším nárůstem celkového množství karotenoidů, podíl torularhodinu opět vzrůstá.

Množství jednotlivých karotenoidů bylo stanoveno pomocí kalibrační křivky pro plochu píku β -karotenu, ze získaných množství jednotlivých karotenoidů bylo vypočteno celkové množství a relativní zastoupení.



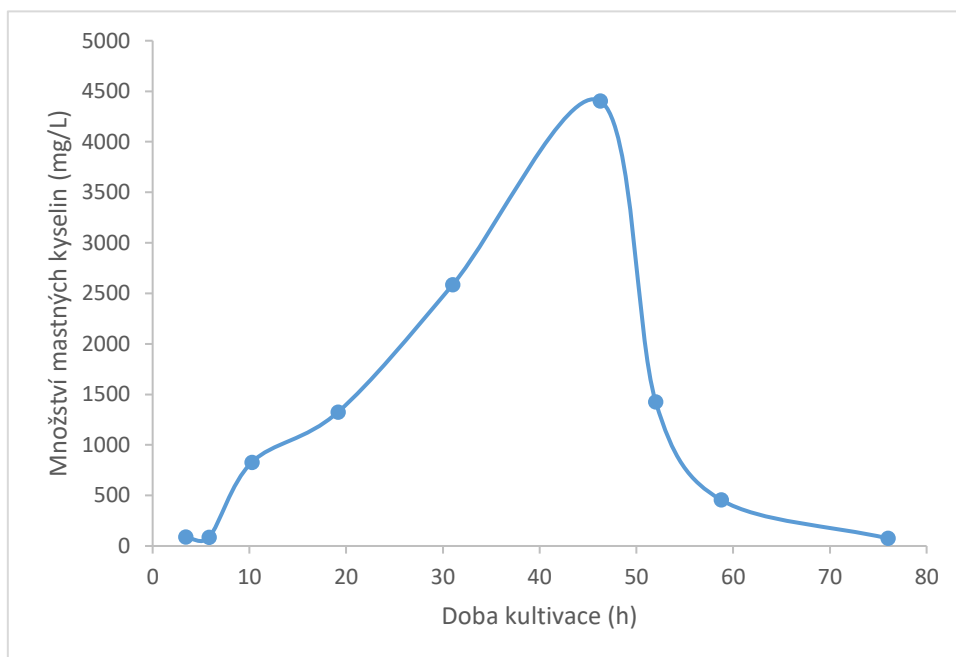
Graf 29: Relativní zastoupení karotenoidů v průběhu kultivace *C. capitatum*



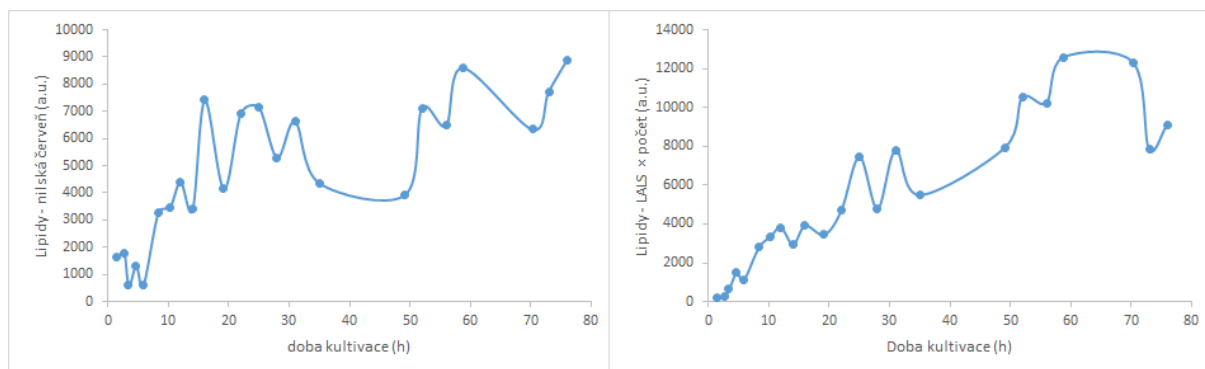
Graf 30: Poměr torularhodin:torulen v průběhu kultivace. Lze vidět vzestup torularhodinu tehdy, když vzrůstá celkové množství karotenoidů

Vyhodnocením stanovení mastných kyselin v lipidické frakci buněk *C. capitatum* pomocí GC-FID (kap. 4.13) byl získán následující Graf 31, který zachycuje časový průběh množství produkovaných mastných kyselin. Pod grafem jsou pro přehlednost uvedena obě cytometrická stanovení lipidů (Graf 32). Lze vidět, že mnohem větší shoda s metodou využívající rozptylu světla nežli s metodou postavenou na Nilské červeni. Pro metodu s rozptylem světla je ovšem problém pozdní fáze kultivace, kdy došel substrát a buňky konzumovaly zásobní lipidy – zatímco data z GC ukazují na výrazný pokles obsahu mastných kyselin (tedy i zásobních

triacylglycerolů), data z rozptylu světla ukazují na konstantní množství, příp. snížené množství na samém konci kultivace.

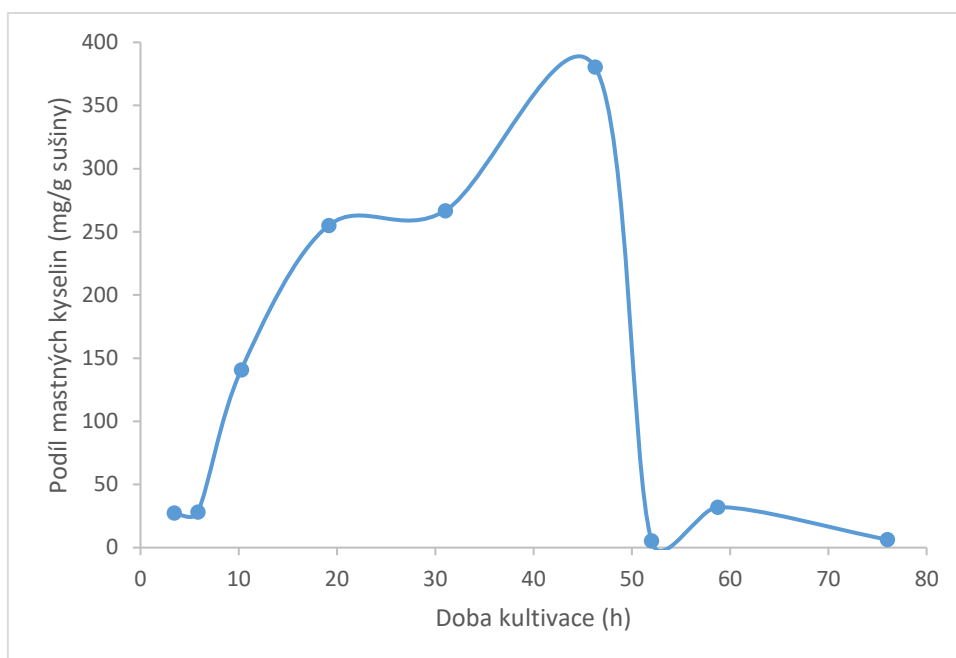


Graf 31: Množství mastných kyselin jako měřítko množství zásobních triacylglycerolů v průběhu kultivace.



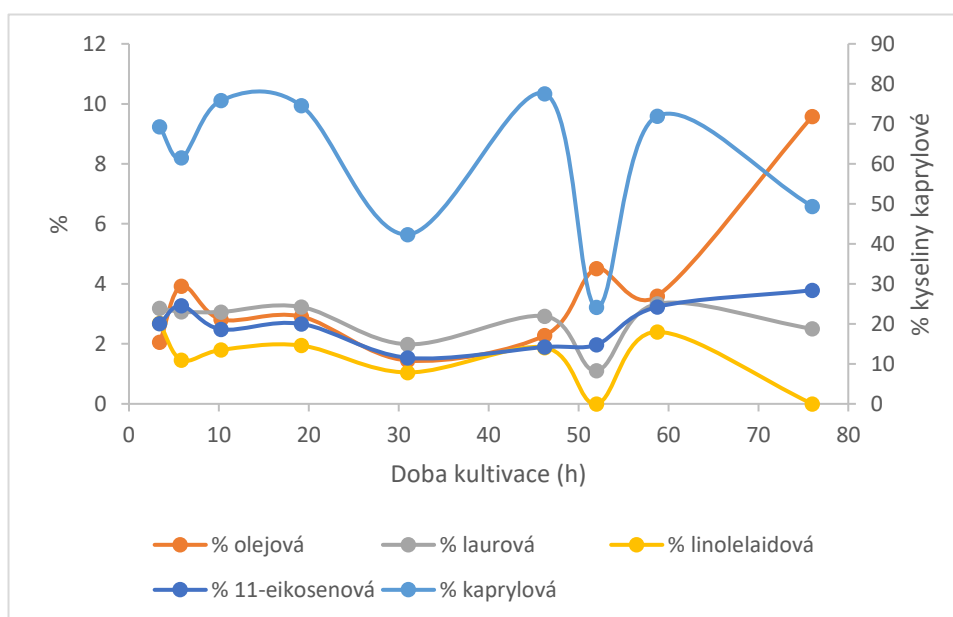
Graf 32: Obě cytometrická stanovení lipidů – nalevo nilská červeň, napravo rozptyl světla

Co se množství mastných kyselin týče, ve svém maximu v cca 46. hodině, tedy zhruba krátce po vyčerpání substrátu, bylo v kultuře 4,4 g/L mastných kyselin, což odpovídá asi 230 mg/g sušiny (23 %, viz Graf 33). Zatímco celková akumulace jeví přibližně lineární nárůst, obsah vzhledem k množství sušiny vykazuje určitou stagnaci mezi 20. a 30. hodinou. Tato stagnace je v čase shodná s rozkmitanými úseky na křivkách získaných pomocí obou cytometrických metod.



Graf 33: Podíl mastných kyselin na sušině *C. capitatum*

Co se týče zastoupení nejhojnějších mastných kyselin ve vzorku přítomných (Graf 34), je zcela dominantní kyselina kaprylová (C8), a to prakticky po většinu kultivace. Zvýšená produkce této kyseliny byla popsána u *S. cerevisiae* za nízkých teplot [83]. Je typické, že psychofilní *C. capitatum* tuto kyselinu ve zvýšené míře produkuje i při vyšších teplotách – nastavení jeho metabolismu na produkci této kyseliny se v tomto případě zdá být jako geneticky podmíněné. U zbývajících uvedených mastných kyselin se v průběhu kultivace zastoupení nijak zásadně neměnilo, až po 50 h došlo k výraznému navýšení relativního obsahu kyseliny olejové.



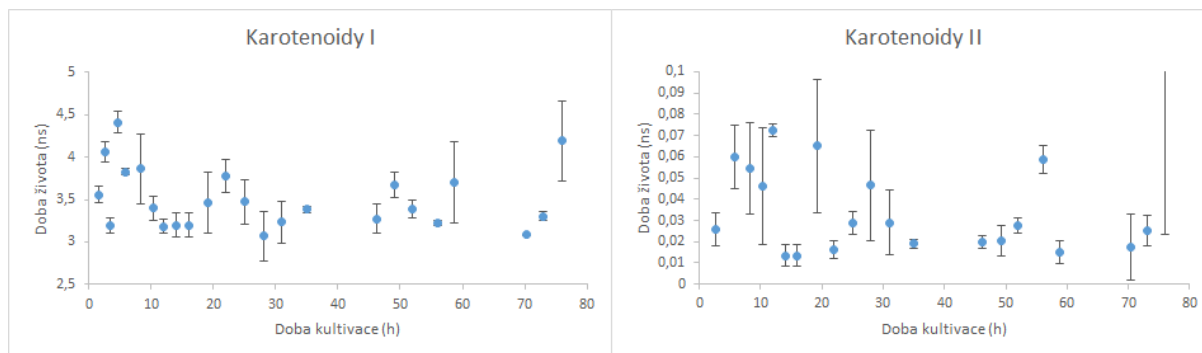
Graf 34: Zastoupení mastných kyselin při kultivaci *C. capitatum*

5.5.3 FLIM snímkování *C. capitatum* v průběhu fermentace

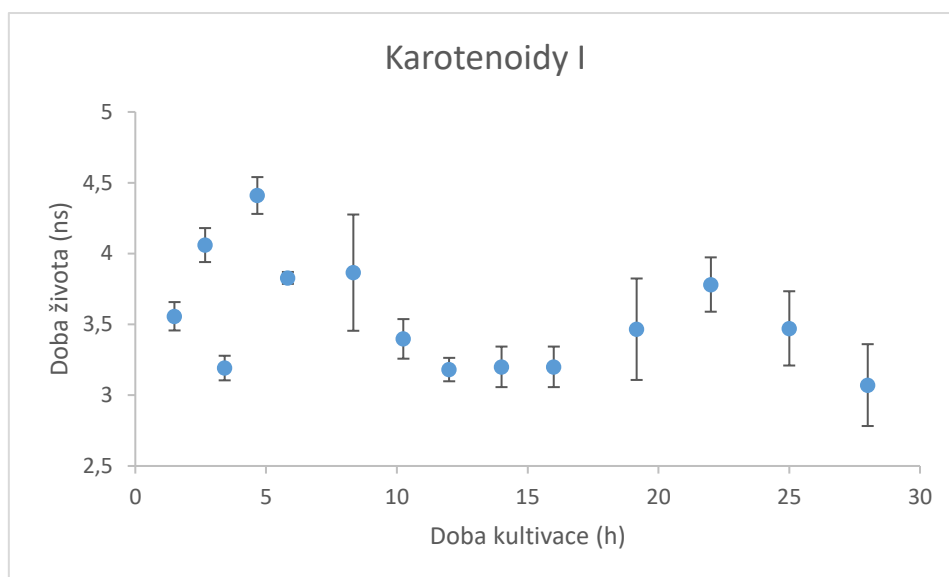
Vzhledem k problematickému seřízení dichroického zrcadla v této kapitole budou uvedeny pouze údaje a grafy týkající se povahy fluorescence a nikoliv snímky samotné, které nejsou příliš dobré kvality.

Experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v kap. 4.10 . Na úvod je uveden přehled dob života fluorescence (Graf 35). Karotenoidy I (membránové, viz kap. 5.1) vykazují oscilace v průběhu kultivace, hned na počátku prvních pěti hodinách lze vidět vzrůst doby života z 3,5 ns na 4,5 ns, který je následován poklesem zpět na původní hodnotu a ještě níže, k 3,1 ns (dosažena po 12 h, viz samostatný Graf 36, který je zaměřen na vývoj doby života Karotenoidů I v prvních třiceti hodinách fermentace). To je obdobné tomu, co bylo možné vidět u zkumavkové kultivace (viz kapitola 5.4 Graf 14). Podobnost pokračuje i následným vzestupem, kdy se doba života membránové formy karotenoidů zvyšuje až zhruba k 3,8 ns okolo 22 h, opět s následným poklesem k hodnotám v rozmezí 3-3,5 ns od 30 h dál zhruba až do konce kultivace. Z průběhu dat lze však usuzovat na další dvě oscilační maxima doby života, jedno okolo 50 h a druhé okolo 80 h. Tyto oscilace ukazují na živé proměny rigidity membránové struktury v průběhu kultivace.

Z výše uvedeného grafu (Graf 30, str. 63) lze vidět, že okolo dvacáté hodiny dochází ke změně ve vývoji vzájemného množství torularhodinu a torulenu ve prospěch torulenu, zatímco v 50 h, kde je potenciálně další maximum oscilace doby života Karotenoidů I, se pak poměr mění opět ve prospěch torularhodinu, tedy oxidovanější formy. Další souvislosti může být, že okolo 20 h dochází k relativnímu zpomalení syntézy zásobních triacylglycerolů, zatímco v 50 h naopak nastává jejich odbourávání (Graf 33).



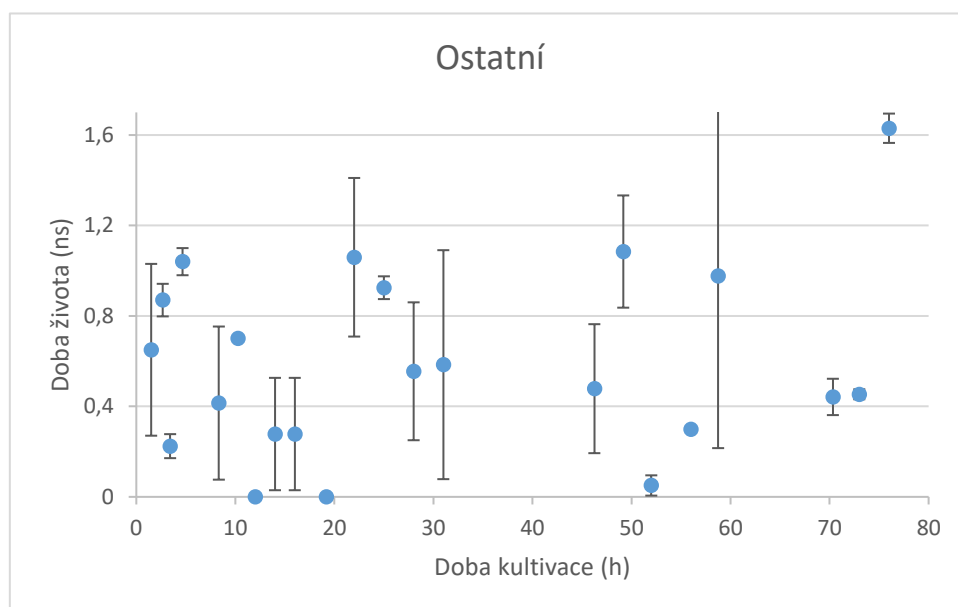
Graf 35: Doby života karotenoidů v průběhu kultivace *C. capitatum*



Graf 36: Doba života membránové formy karotenoidů v první polovině kultivace - detail

Karotenoidy II (forma vyskytující se v LB) také vykazují oscilaci doby života (Graf 35). Na samotném počátku kultivace v prvních několika hodinách nebyl zachycen signál odpovídající karotenoidům v granulích. Od 6 h však odpovídající fluorescence zachycena je, s poklesem od 0,06 do 0,013 ns. Na hodnotách 0,013-0,016 ns se doba života udržela mezi 14-22 h. Poté nastává vzestup, který vrcholí u 28 h a navrácí se u 35 h k původním hodnotám. Další takový pík je mezi 52. a 59. hodinou. Tedy tyto píky se zvýšenou dobou života (a pravděpodobně větší rigiditou struktur) následují obdobné píky u Karotenoidů I.

Níže na Graf 37 je přehled všech ostatních dob života zachycených v průběhu kultivace.



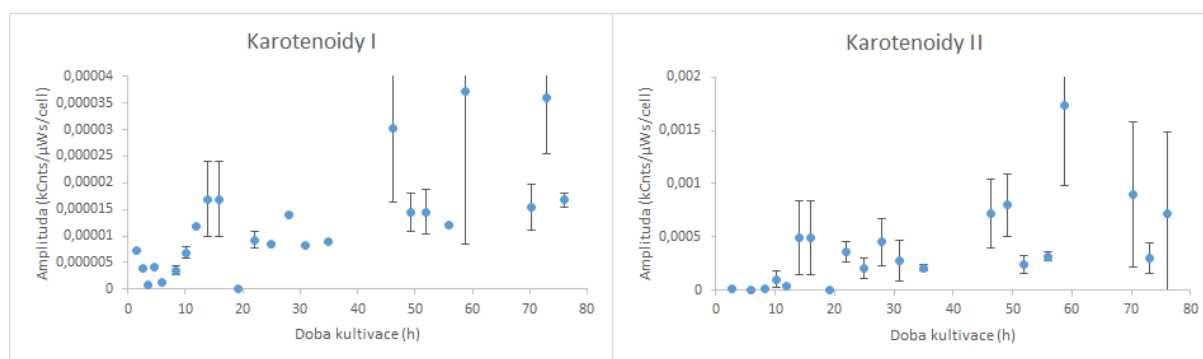
Graf 37: Směs třetích dob života pozorovaných v průběhu kultivace *C. capitatum*. V rozmezí do 0,4 ns se jedná o Karotenoidy III, rozmezí 0,4-0,8 ns pak koenzymy, nad 0,8 ns pak zřejmě trimerní forma Karotenoidy IV

Jde vidět velmi široké rozpětí, které ztěžuje jednoznačnou identifikaci. Pro doby života do 0,4 ns se může jednat o Karotenoidy III, ovšem stejně tak – vzhledem k chybovým

rozmezím – i o dobu života nasvědčující poměru NAD/NADH, který je velmi vychýlen ve prospěch redukované formy. Rozpětí 0,4-0,8 ns je zřejmě koenzymové, ovšem nad hranicí 0,8 ns se do hry dostává lipozomální/váčková forma Karotenoidy IV. Pokud použijeme orientační interpretaci založenou na úvaze, že doba života plně přináleží koenzymům, alespoň pro prvních třicet hodin kultivace, pak v prvních pěti hodinách vzrůstající doba života nasvědčuje aktivaci katabolismu, což je následováno intenzivní syntetickou činností (zhruba do 16 h), po 20 h nastává opět stav favorizující oxidovanou formu koenzymů (katabolismus).

Amplitudy vztažené na buňku (Graf 38) ukazují na zvýšení obsahu membránových karotenoidů mezi 8-14 h (navzdory tomu v té době klesá odpovídající doba života), toto množství pak zůstává zhruba konstantní, resp. po 30 h se pomalu zvyšuje. Množství granulárních karotenoidů se také zvyšuje mezi 8-14 h, poté ovšem pomalu klesá, resp. po 30 h se stabilizuje na určité hladině, od které se odchyluje jen v některých měřeních zatížených velkou chybou.

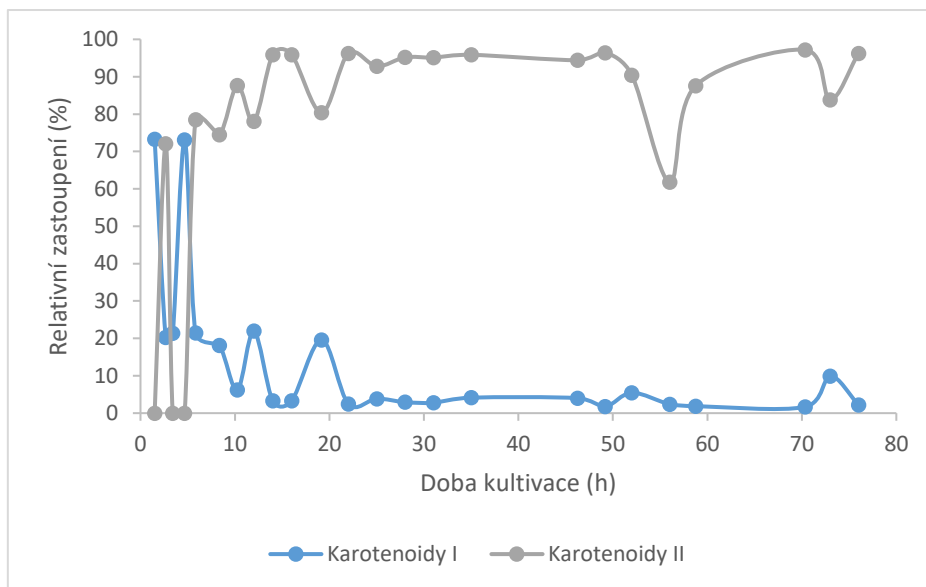
Tedy hlavní nárůst množství karotenoidů připadá zhruba na období mezi 8. a 14. hodinou, kdy se zvyšuje množství karotenoidů jak v membránách, tak v granulích. Po 30. hodině, postupem stacionární fáze, se pomalu zvyšuje množství karotenoidů v membránách, zřejmě za účelem ochrany buněčného obsahu před nepříznivými vlivy z okolí.



Graf 38: Amplitudy karotenoidů v průběhu kultivace *C. capitatum*

Zvláštní je, že mezi 8-14 h, kdy dochází k vzestupu koncentrace karotenoidů jak v membránách, tak v granulích, dochází současně k poklesu doby života karotenoidů v těchto prostředích. To ukazuje na to, že karotenoidy nemají zásadnější vliv na fluiditu membrány, navzdory možným π - π interakcím vytvářejícím v membráně „zarážky“ omezující fluiditu, ať už se jedná o interakce mezi karotenoidy samotnými nebo mezi karotenoidy a ergosterolem. To tedy činí z karotenoidů výborné buňkám vlastní fluorescenční sondy na monitoring viskozity lipidických prostředí. Nezávislost viskozity (membrán, granulí) na obsahu karotenoidů (v rámci pozorovaných množství) umožňuje *in vivo* pozorování změn viskozity a fluidity těchto prostředí, typicky regulovaných množstvím ergosterolu a sterylesterů [45].

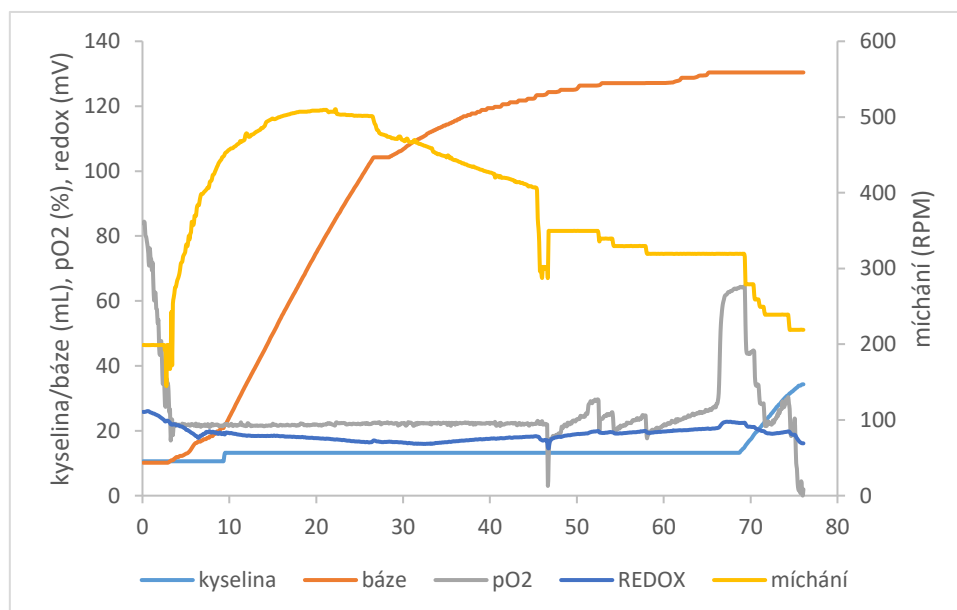
Na Graf 39 níže je vystiženo relativní zastoupení dob života karotenoidů. Je zřejmé, že už přinejmenším od 10. hodině dominuje (> 80%) forma karotenoidů v granulích, Karotenoidy II. Počáteční rozkolísané hodnoty jsou především způsobeny absencí této doby života ve vzorcích (hodnota 0 %).



Graf 39: Relativní zastoupení jednotlivých forem karotenoidů v průběhu fermentace *C. capitatum*

5.6 Fermentorová kultivace *Cystofilobasidium macerans*

Kultivace *C. macerans* byla provedena dle postupu uvedeného v kap. 4.8 . Na níže uvedeném Graf 40 je přehled časového průběhu parametrů sledovaných on-line v průběhu fermentorové kultivace.



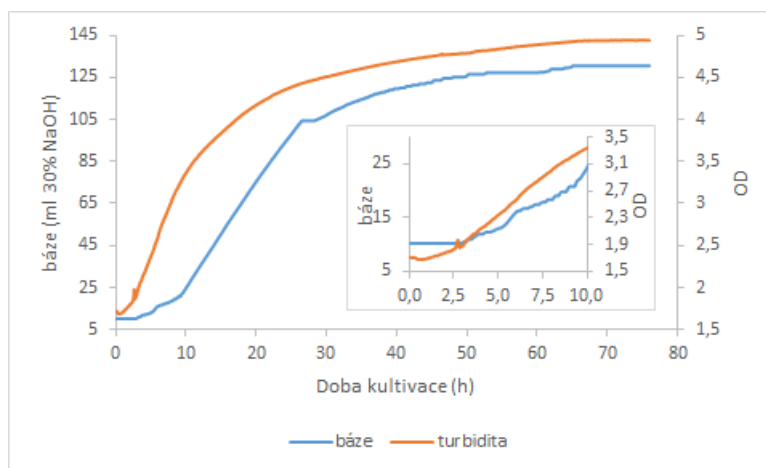
Graf 40: Vývoj online měřených parametrů při kultivaci *C. macerans* ve fermentoru

Teprve po 3 h (vs 1,4 h u *C. capitatum*, srov. Graf 16, str. 55) došlo k poklesu DOT takovému, že započal prudký vzestup otáček. Tento vzestup ovšem není tak prudký jako v případě fermentace *C. capitatum* (dále jen CC, viz Graf 16), buď z důvodu nižších růstových schopností *C. macerans* (dále i jen CM), nebo v důsledku mírné inhibice růstu vlivem vyšší (dvojnásobné) koncentrace glukózy (60 g/L), což je zřejmě pravděpodobnější.

Po prudkém nárůstu otáček tyto jen velmi zvolna snižují rychlost, oblast se zhruba

konstantními otáčkami je mezi 15.-26. hodinou. Poté následuje pozvolný pokles otáček (před 48 h byl zaveden režim manuálního nastavování z důvodu nestability regulace otáček).

K zastavení spotřeby báze zde dochází až v samotném závěru kultivace (66,25 h, vs 45 h u CC, viz Graf 16, str. 55), což ukazuje, že zvýšené množství glukózy má pozitivní vliv na prodloužení doby akumulace metabolitů. Spotřeba kyseliny začíná až u 68,66 h, tedy je zde zhruba 2,5 h rozdíl mezi koncem dávkování báze a počátkem dávkování kyseliny – oproti rozdílu cca 1 h u CC, ovšem při 30 g/L glukózy na počátku a při pH 6,5 (zde pH 5,5). Tyto rozdíly stěžují interpretaci delší doby, tj. pomalejšího přechodu pH média do zásaditějších oblastí než je nastavené rozmezí pH.

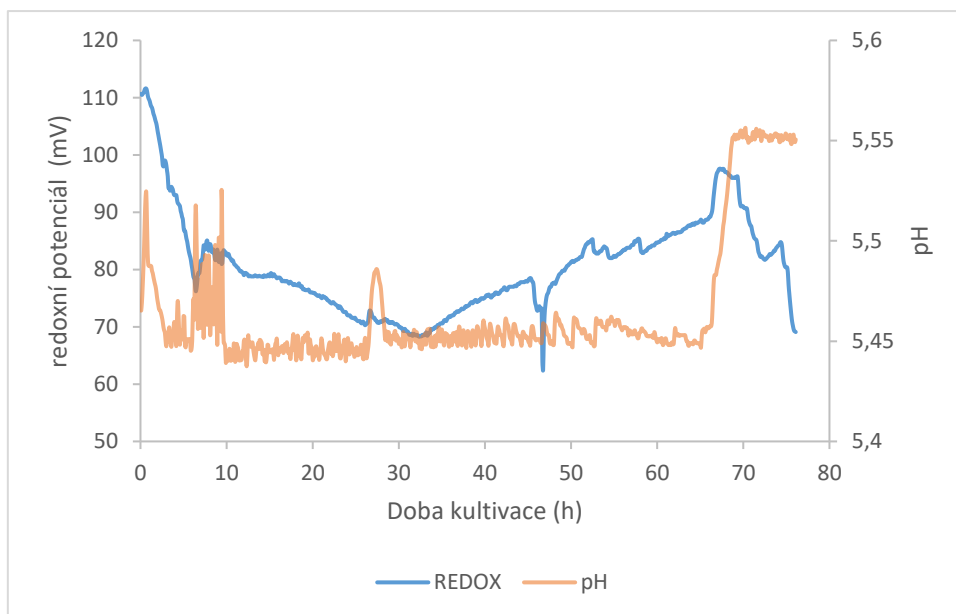


Graf 41: Turbidita a spotřeba báze v průběhu kultivace

Graf 41, který je věnován studiu samostatně báze a turbidity, včetně přiblížení prvních deseti hodin (rámeček), zaznamenává dvě zásadní změny v časovém profilu spotřeby báze. První změnou je přechod do lineárního režimu spotřeby báze okolo 10 h a druhou pak je ukončení tohoto režimu v 27 h. U CC fermentace tento režim nebyl až tak zřejmý, u CM má jasný průběh i ohraničení. Konstantní rychlost spotřeby báze naznačuje konstantní rychlost vývinu kyselých metabolitů buňkami, což naznačuje konstantní metabolickou aktivitu v jednotkovém objemu. To ovšem neznamená konstantní metabolickou aktivitu na jednotku biomasy, pokud se jedná o množící se buňky. Kombinace této informace s informacemi výše uvedenými (Graf 45 v sekci 5.6.1), tedy s grafem obsahujícího data o počtu buněk v jednotce objemu suspenze, lze vidět, že v době mezi 10-26 h množení buněk pokračuje, nicméně se nejedná o exponenciální fázi, ale o fázi zpomaleného (zpomalujícího) růstu. Tato fáze je neobvykle dlouhá a jeví se tak být určitým způsobem specifická – ovšem toto zjištění bude vyžadovat další ověření jak u tohoto druhu kvasinek, tak i u druhů příbuzných. Důležité z hlediska sledované konstantní rychlosti spotřeby báze je, že si lze snadno představit, jak zpomalující se množení a i metabolická aktivita (na jednotku biomasy) je vzhledem ke zvyšujícímu se počtu buněk vyvážená tak, že produkce kyselých metabolitů zůstává konstantní.

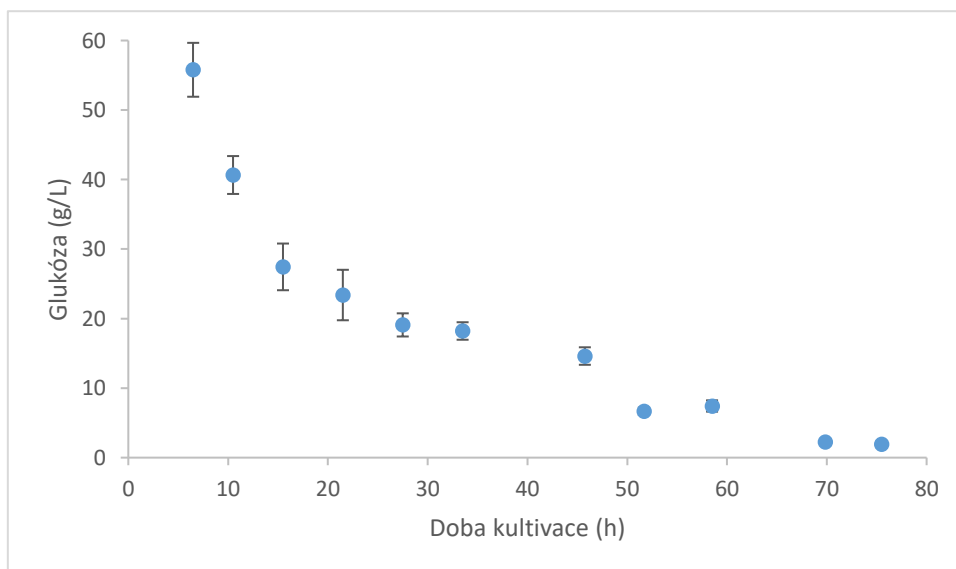
Další diskuze bude zaměřena na vývoj redoxního potenciálu média (Graf 42) a možné metabolické souvislosti. Okolo 1 h končí období konstantního redoxního potenciálu a jeho hodnota se začíná snižovat. Toto snižování trvá do 6,5 h, poté následuje krátký vzestup následovaný opět poklesem, trvajícím až do 32-33 h. Od té chvíle je opět vidět setrvalý

vzestup, který ustává až se změnou regulace pH – kdy namísto dávkování báze je pro udržení pH 5,5 dávkována kyselina. Tyto zde zmíněné přechody budou dále diskutovány především v souvislosti s měřeními na cytometru a FLIM zobrazováním.



Graf 42: Vývoj redoxního potenciálu a pH media v průběhu fermentorové kultivace *C. macerans*

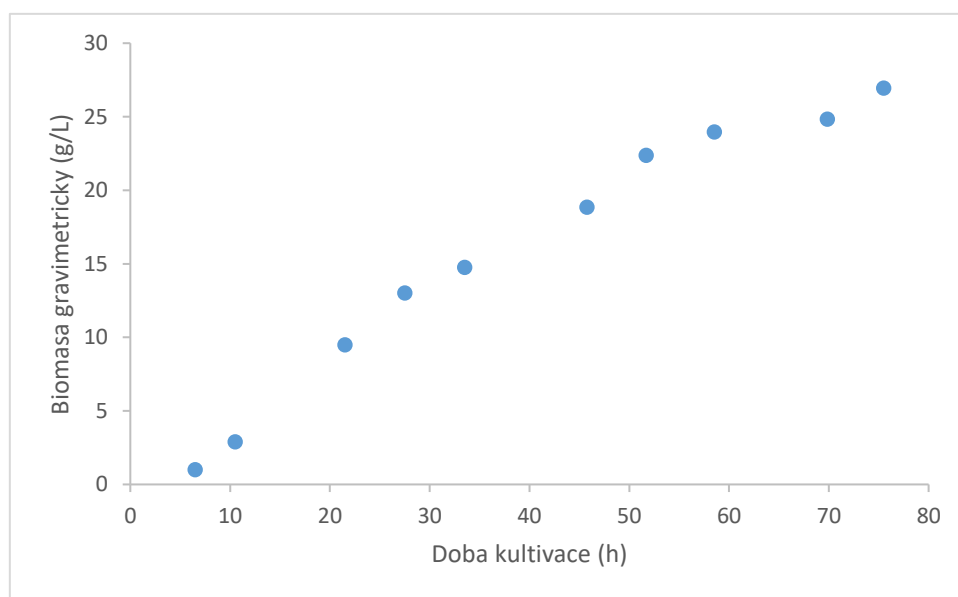
Z Graf 43 ukazujícího vývoj hladiny reziduálních cukrů (glukózy) v médiu (viz kap. 4.14) lze vidět průběh připomínající sigmoidní závislost. Nicméně rychlou konzumaci glukózy mezi 6-15 h střídá snižující se rychlost spotřeby, která okolo 30 h jeví tendenci úplného ustání následovaného zhruba lineárním vyčerpáváním zbývajících glukózy. Konstantní hladiny rezidua je dosaženo zhruba po 70. hodině. Interval rychlé konzumace mezi 6-15 h se překrývá s exponenciální fází a první polovinou fáze zpomalujícího růstu (viz Graf 45 níže).



Graf 43: Spotřeba glukózy v průběhu kultivace *C. macerans*

Výše lze vidět, že v době ustání spotřeby glukózy a přepnutí do režimu lineární spotřeby

po 30 h dochází ke „zlomu“ i na křivce redoxního potenciálu. Stejně tak v době zpomalování spotřeby glukózy před 30 h dochází ke změně režimu spotřeby báze – z lineárního režimu na chvíli ustává a pak následuje další spotřeba volnějším tempem. Spotřeba báze pak ustává přibližně tehdy, kdy se dá očekávat přechod do stavu konstantní koncentrace reziduální glukózy, stejně jako tomu bylo u CC. To vede k domněnce, že pomocí zastavení spotřeby báze by se dal stanovit okamžik „vyčerpání“ zdroje uhlíku, resp. pomocí rychlosti spotřeby báze by šla odhadovat rychlost spotřeby uhlíkatého substrátu (glukózy). To by mohlo být využito k levnému monitoringu a řízení procesu, konkrétně při fed-batch fermentacích by semi-kontinuální dávkování substrátu bylo spřaženo s monitoringem spotřeby báze namísto pořizování drahých přístrojů pro on-line stanovení.



Graf 44: Gravimetricky stanovená biomasa v průběhu kultivace *C. macerans*

Na Graf 44 je vystižen průběh množství biomasy (sušiny) v průběhu kultivace. Při této fermentaci byla sušina stanovována vedle cytometrie (níže) také gravimetricky (viz kap. 4.9). Až do 60. hodiny lze pozorovat v podstatě lineární nárůst množství biomasy, produkce lipidů vyvážila ustávající množení buněk.

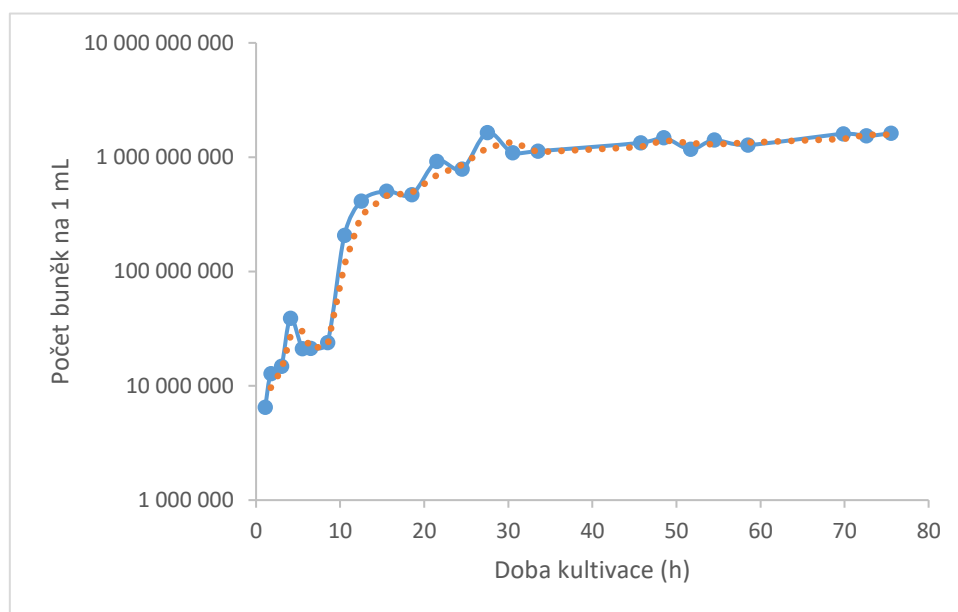
5.6.1 Průtoková cytometrie v průběhu fermentace *C. macerans*

Nyní budou diskutovány výsledky získané průtokovou cytometrií při fermentaci *C. macerans* dle postupu uvedeného v kap. 4.9. Na prvním grafu (Graf 45) lze vidět vývoj počtu buněk v kultuře. Při fermentaci CM bylo dosaženo zhruba o řád vyššího počtu buněk než v případě CC (srovn. Graf 21). Zvláštním jevem je (zdánlivé?) udržování počtu buněk mezi 6,5-8,5 h, tedy v asi v první polovině exponenciální fáze. To lze vysvětlit tím, že rychle se množící buňky se od sebe neoddělovaly, pučící buňky zůstávaly spojeny s mateřskou. Vzhledem k nastavení vyhodnocování tak, aby byly brány v potaz tzv. „single cell events“, tedy případy, kdy do paprsku laseru vstoupí prokazatelně jedna buňka, byly takové klastry buněk odfiltrovány. To se může projevit právě zdánlivou stagnací kultury, kdy jsou zaznamenávány jen „osamělé“ buňky, zatímco buňky obklopené dceřinými jsou vyloučeny.

Zhruba do 30 h dochází k pozvolnému nárůstu buněk, což je v souladu s trváním zvýšené

(oné „lineární“) spotřeby báze. Následně již počet buněk fluktuuje okolo hodnoty $1,4 \cdot 10^9 \text{ mL}^{-1}$.

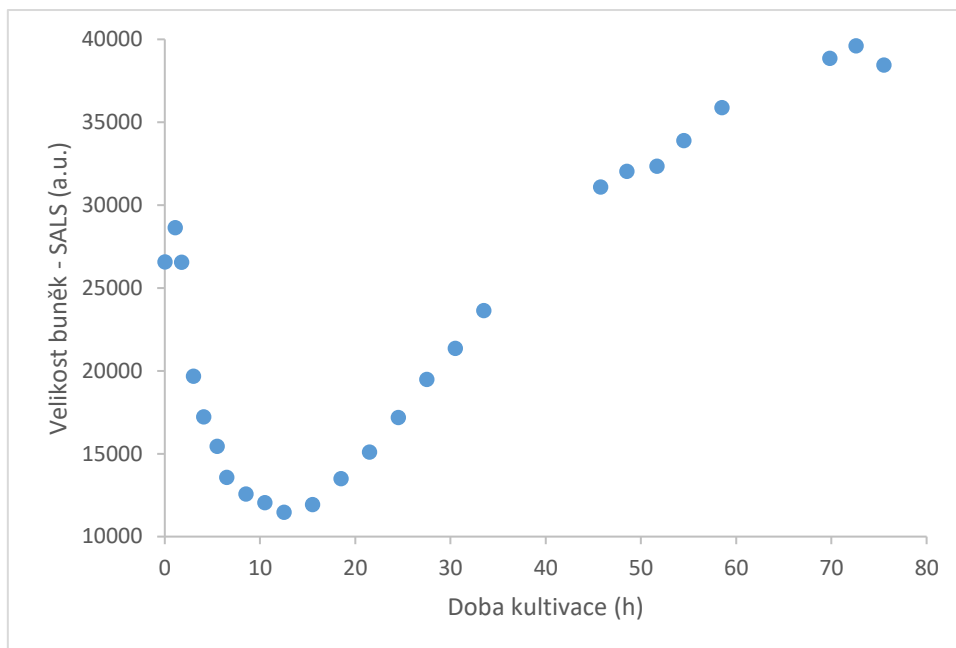
Co se velikostí buněk týče (posuzováno opět pomocí SALS, viz kap. 4.9 a 5.5.1), od počátku kultivace až do 12,5 h lze pozorovat výrazný pokles velikosti (Graf 46). 12,5 h už spadá do období, kdy se počet otáček mění už jen velmi pomalu. Poté velikost buněk v důsledku akumulace zásobních lipidů roste zhruba až do chvíle, kdy je vyčerpána glukóza, poté se velikost buněk jeví být konstantní. Růst velikosti proběhl zřejmě ve dvou fázích, rychlejší a pomalejší, jejichž přechod spadá do období mezi 33,5 a 45,75 h, tedy do období druhé noci kultivace, kdy nebyl odběr vzorků realizován. Souvislost zpomalení růstu velikosti buněk s vyčerpáváním glukózy a přechodem do jiného režimu její spotřeby (viz výše) je zřejmá.



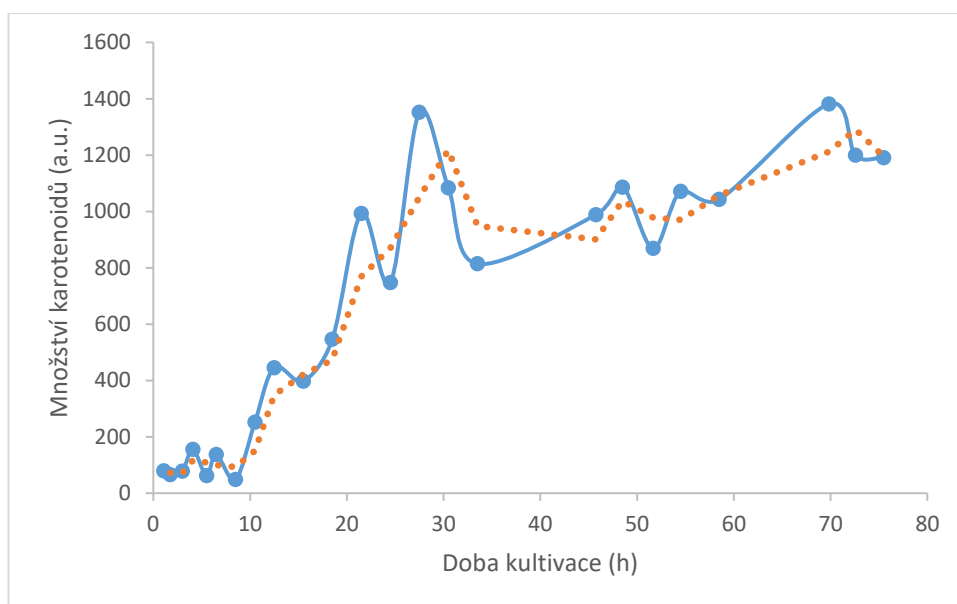
Graf 45: Počet buněk *C. macerans* v průběhu kultivace ve fermentoru

Co se cytometricky odhadnutého množství karotenoidů týče (Graf 47), maxima je dosaženo okolo 30. hodiny. Poté je zaznamenán pokles, který je následován pomalým vzestupem množství karotenoidů na množství, které bylo přítomno v 30 h.

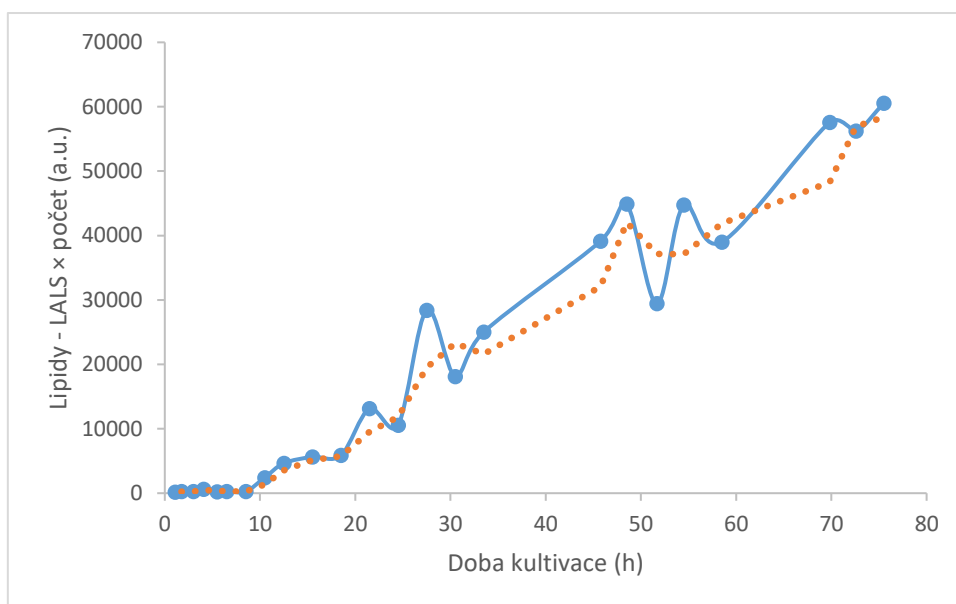
Množství lipidů je i zde hodnoceno dvěma způsoby a metoda využívající rozptylu světla vykazuje opět lepší výpovědní hodnotu (Graf 48 a Graf 49). Tento způsob ukazuje na růst množství zásobních lipidů v podstatě po celou dobu kultivace, s tím, že na konci je zde cca 5× více lipidů než v maximu u CC. Jak se dále v sekci 5.6.2 ukáže, není toto srovnání vhodné a neodpovídá naměřeným obsahům triacylglycerolů, resp. mastných kyselin. Rozdíl v rozptylové metodě může být způsoben odlišnými vlastnostmi intracelulárních prostor CC a CM za daných podmínek kultivace, kterým byly vystaveny. Konkrétně u CM jsou po většinu kultivace intracelulární zásobní lipidy skladovány v podobě vícero drobných granulí (viz snímky v sekci 5.6.3), zatímco CC skladuje tak, že má obvykle jednu až dvě „supersized“ granule doprovázené několika menšími. Je zjevné, že větší množství malých granulí bude více rozptylovat světlo nežli jedna velká granule.



Graf 46: Velikost buněk *C. macerans* v průběhu kultivace, měřená pomocí rozptylu světla



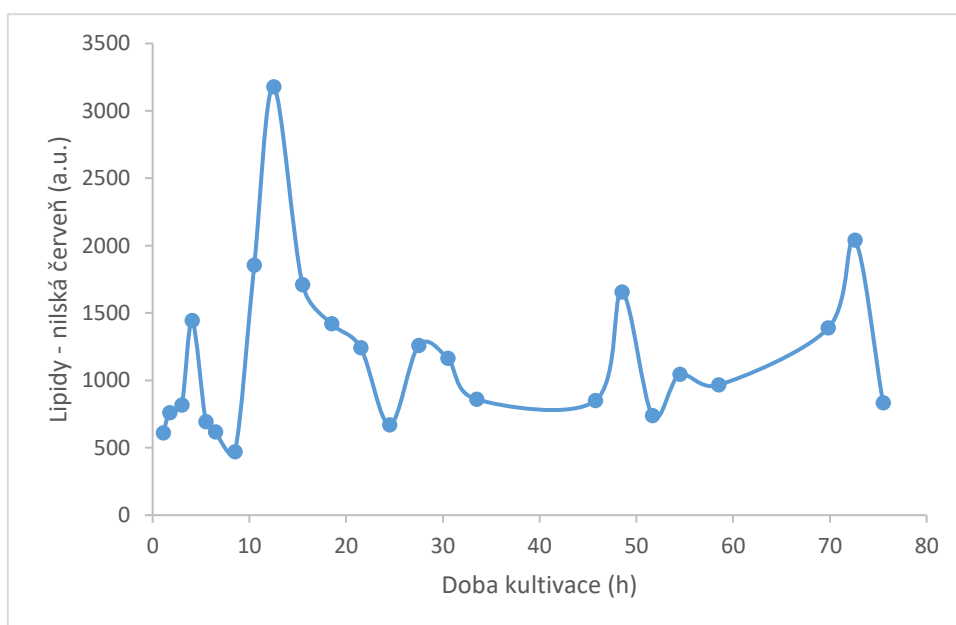
Graf 47: Množství karotenoidů odhadnuté pomocí průtokového cytometru – autofluorescence buněk při 590 nm



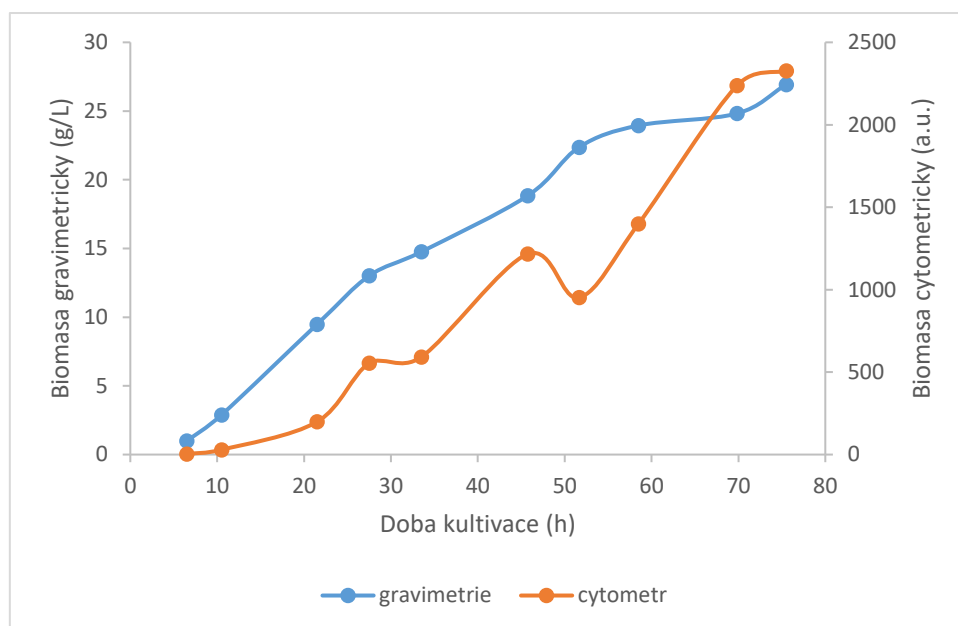
Graf 48: Odhad množství lipidů *C. macerans* pomocí bočního rozptylu světla

Metoda využívající ke stanovení barvení Nilskou červení i nyní neposkytla uspokojivé výsledky (viz Graf 49) – ukazuje se, že tato metoda zřejmě není vhodná pro monitoring přrůstku lipidů.

Díky provedenému gravimetrickému stanovení je u CM možné provést porovnání stanovení biomasy pomocí cytometrie dle [84] se standardní metodou – gravimetrií (Graf 50). Cytometrické stanovení (vyjádřené v a.u.) je mnohem více rozkolísané, navíc je zde zřejmý rozdíl v průběhu obou křivek – zatímco gravimetrie je konkávní, cytometrická křivka je konvexní. Tento rozdíl zásadním způsobem ukazuje na rozdílnost mezi gravimetrií a použitým modelem využívajícím průtokovou cytometrii (Graf 50).



Graf 49: Odhad množství lipidů získaný z fluorescence nilskou červení obarvených buněk na průtokovém cytometru

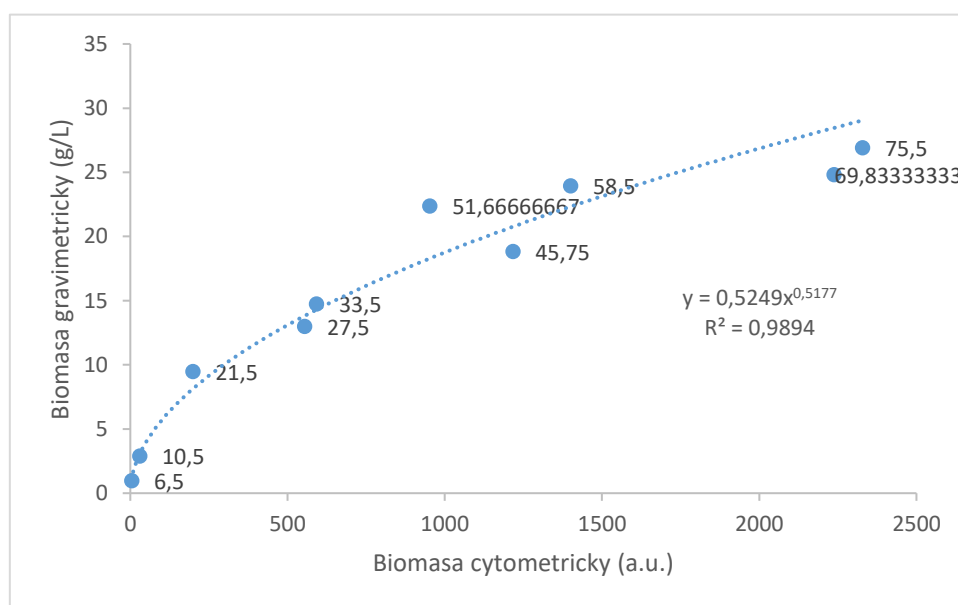


Graf 50: Porovnání gravimetrie a cytometrie pro stanovení biomasy

Proto byla proti sobě vynesena gravimetrická data a vypočtené hodnoty biomasy dle dat z cytometru (Graf 51). K proložení bodů křivkou byla použita regrese dostupná v MS Excel. Získaná závislost má poměrně dobrý koeficient determinace. Tvar takto získané závislosti možno zapsat jako

$$grav = \frac{1}{2} \sqrt{CTM} = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{SALS \cdot LALS \cdot POČET}{10^{12}}}$$

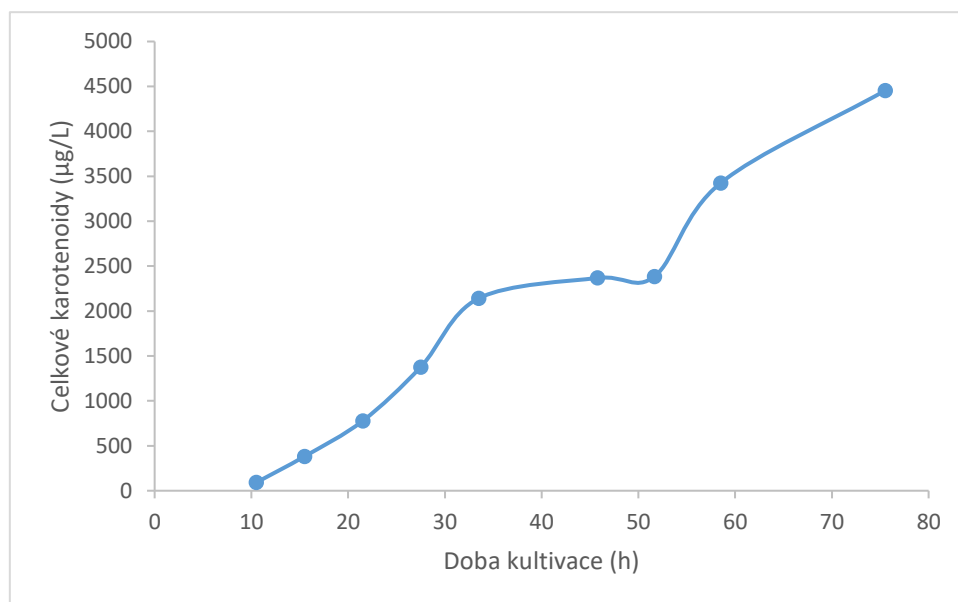
kde *grav* značí hodnotu gravimetricky stanovené biomasy (g/L), *CTM* hodnotu cytometricky stanovené biomasy (a.u.).



Graf 51: Závislost mezi cytometrickým a gravimetrickým stanovením pro *C. macerans*

5.6.2 Stanovení karotenoidů pomocí HPLC, stanovení mastných kyselin pomocí GC a porovnání s časovými profily získanými pomocí průtokového cytometru

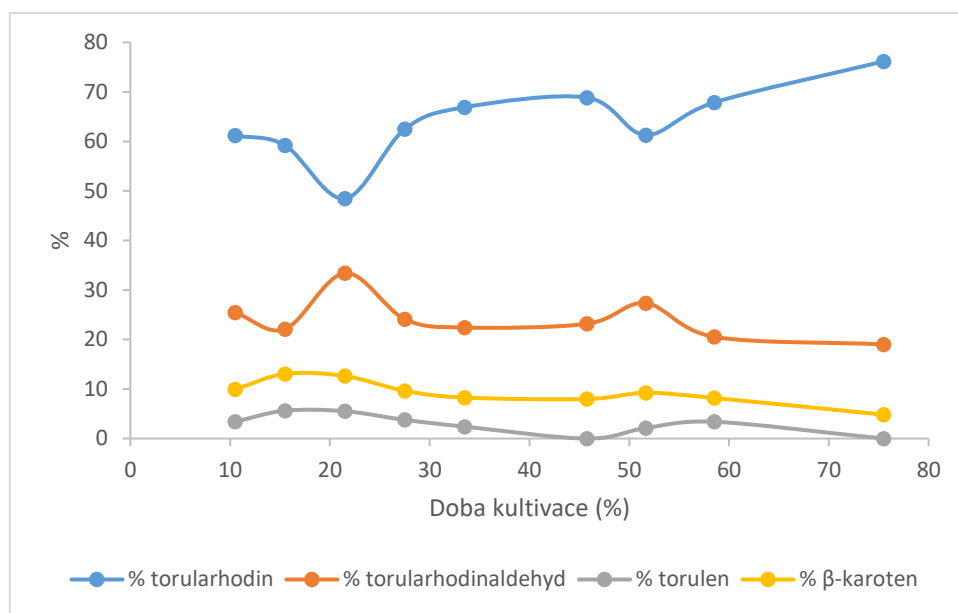
V průběhu fermentorové kultivace byly v kultuře *C.macerans* analyzovány metabolické parametry dle postupů uvedených v kap. 4.11 - 4.13 . Ze získaných závislostí lze vidět, že časový profil množství karotenoidů, zjištěný pomocí průtokové cytometrie (Graf 47), opět není v souladu se standardní HPLC metodou, jejíž výsledky jsou v Graf 52. Ve 30 h, v souladu s údaji z průtokového cytometru, množství karotenoidů dosahuje na určitý čas svého maxima, do 50 h množství zůstává prakticky stejné a poté dochází k výraznému nárůstu množství karotenoidů, které trvá až do konce kultivace v 75,5 h. Ustání syntézy u 30 h se pojí s výše zmíněným časově shodným ustáním množení buněk, projevujícím se změnou charakteru spotřeby báze a přechodem k jinému charakteru utilizace substrátu (viz výše). Až na toto kratší utlumení syntézy karotenoidů je zajímavý nápadně lineární průběh syntézy karotenoidů u CM až do 80.hodiny kultivace.



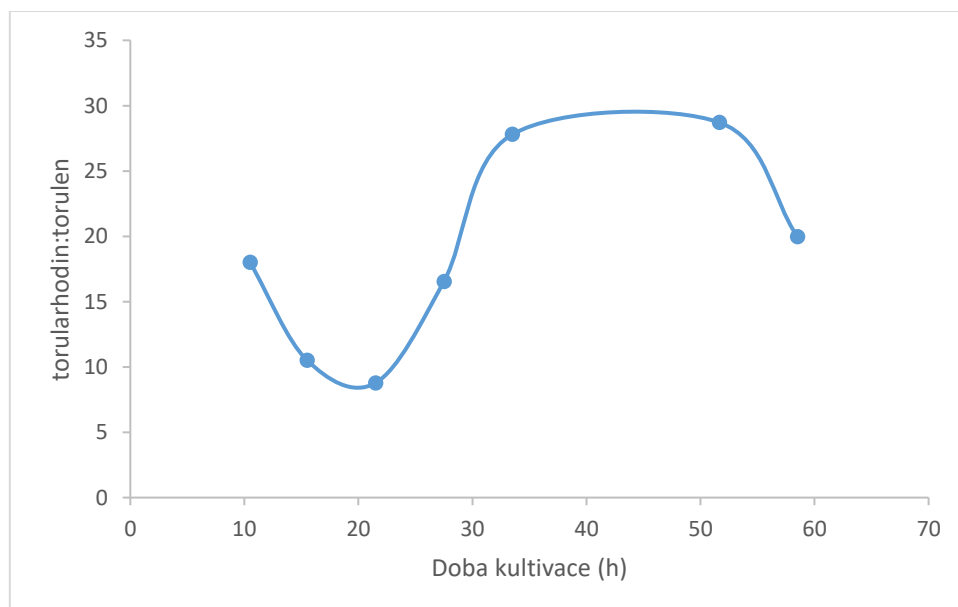
Graf 52: Množství karotenoidů u *C. macerans* po Folchově extrakci, stanovené pomocí HPLC

Graf 53 ukazuje, že jednoznačně dominantním karotenoidem u CM za daných podmínek byl torularhodin (u CC byly torularhodin a torulen přibližně stejně zastoupené po většinu kultivace). Obecně vypadají profily zastoupení velmi stabilně v průběhu celé kultivace, přibližně konstantní, ovšem zastoupení torularhodinu průběžně vzrůstá na úkor ostatních karotenoidů, včetně torularhodinaldehydu. Kvantifikace karotenoidů a stanovení relativního zastoupení karotenoidů proběhlo stejně jako v kapitole 5.5.2

Poměr torulenu a torularhodinu se naprosto zásadně liší od situace u CC – zde dosahoval torularhodin nejvýše dvojnásobné koncentrace oproti torulenu. U CM (Graf 54) však je přinejmenším 10× více torularhodinu (okolo 20 h), přičemž tento poměr se snižoval s množением buněk. Po 20 h se poměr opět zvyšuje, ale po třicáté hodině (souvislosti viz výše) se stabilizuje pod 30-ti násobkem torularhodinu ku torulenu. V posledním vzorku ze 75,5 hodiny nebyl torulen zaznamenán, proto graf 54 končí vzorkem z 58,5 h. Tento průběh odpovídá intenzivním oxidačním procesům v buňce.

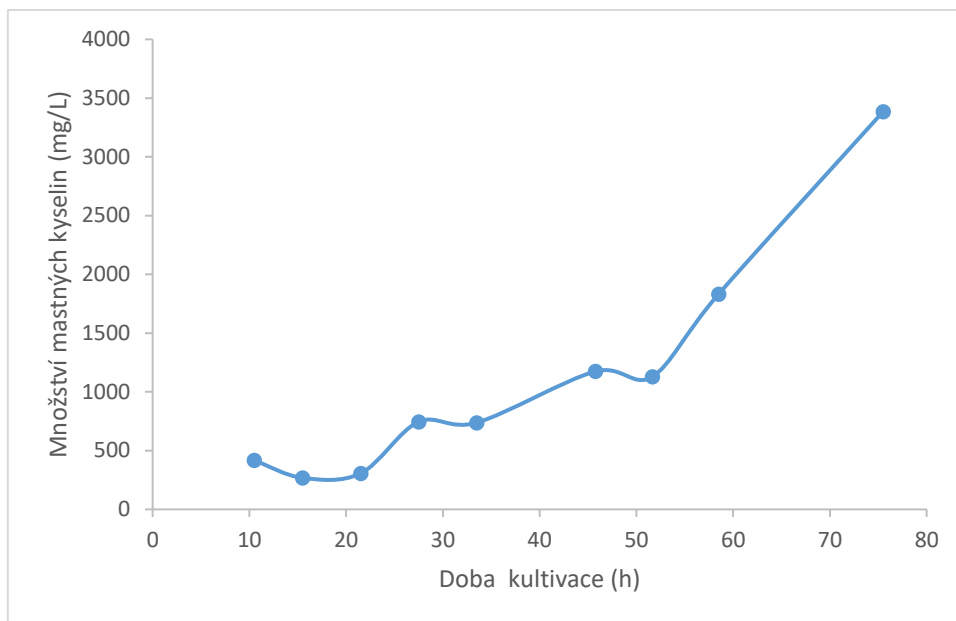


Graf 53: Relativní zastoupení jednotlivých karotenoidů v průběhu kultivace *C. macerans*

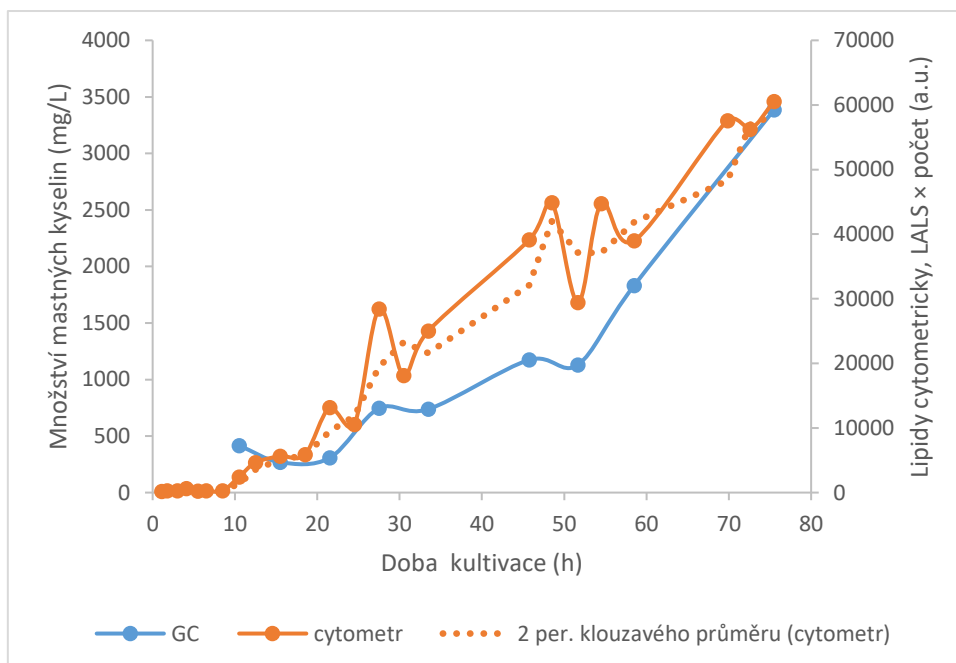


Graf 54: Poměr torularhodin:torulen v průběhu kultivace *C. macerans*

Graf 55 uvádí vývoj množství mastných kyselin jakožto hlavního představitele zásobních lipidů. Mezi 10-20 h, kdy byla kultura ve fázi exponenciálního až zpomaleného růstu, množství mastných kyselin nijak nevzrůstá. Teprve po 20 h, když se množení buněk dále zpomaluje, začíná syntéza MK nabývat na významu a množství MK v kultuře vzrůstá přibližně lineárně, až do asi 50. hodiny. Poté se akumulace zrychluje, stejně jako je v té době akumulováno více karotenoidů (výše, Graf 52).



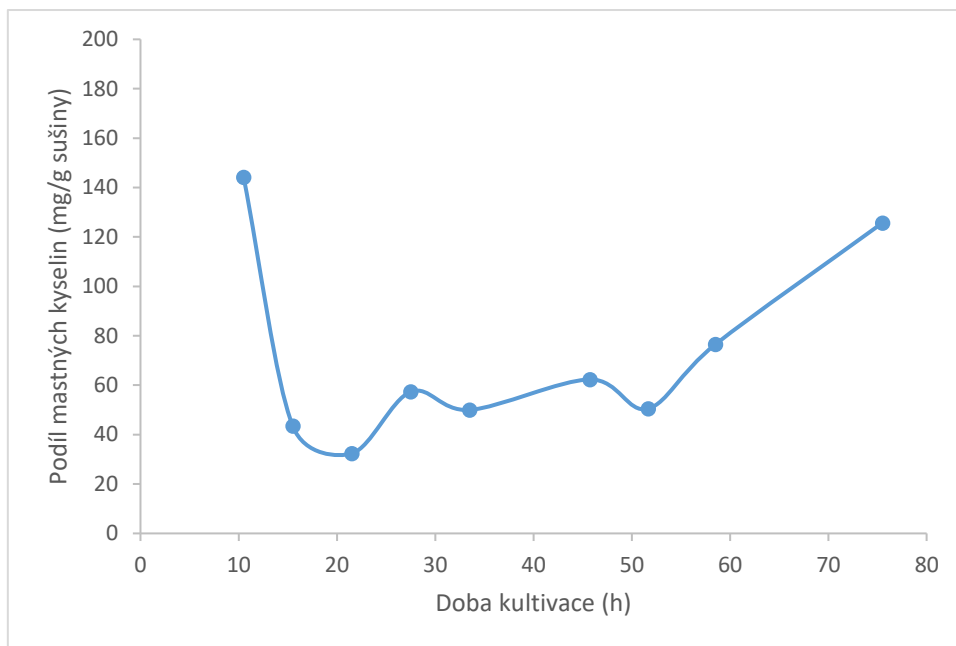
Graf 55: Množství mastných kyselin v průběhu kultivace *C. macerans*



Graf 56: Porovnání stanovení lipidů pomocí GC a průtokové cytometrie (rozptylová metoda). Data z cytometru jsou zde také vyhlazena pomocí klouzavého průměru (použita 2. perioda).

Porovnání množství lipidů stanovených pomocí cytometru (metoda rozptylová) a pomocí GC ukazuje alespoň na základní shodu, spočívající v tom, že obě metody shodně dokumentují růst množství lipidů až do konce kultivace (Graf 56).

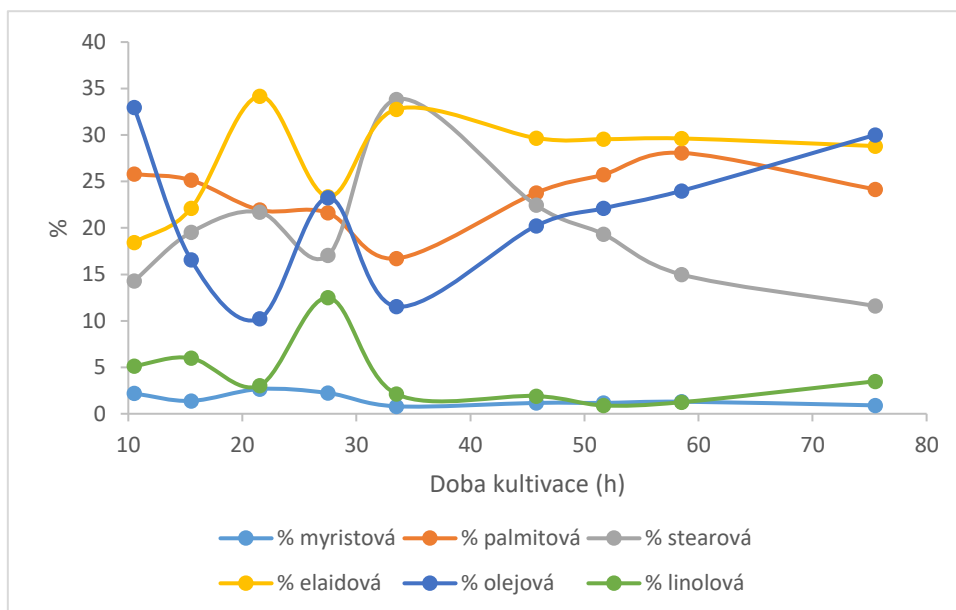
Podíl mastných kyselin na složení biomasy v průběhu kultivace je vystižen na Graf 57. S množením buněk tento podíl klesá, po 20 h pomalu začíná narůstat a po 50 h dochází ke zrychlení akumulace.



Graf 57: Podíl mastných kyselin na sušině *C. macerans*

Zvláštní je, že podíl MK na biomase je na konci kultivace pouze 12,5 %, oproti CC, kde dosahoval až 40 %. Přitom množství MK bylo v maximum asi 3,3 g/L, u CC 4,4 g/L, tedy v množství není rozdíl tak zásadní. Do provedení dalších experimentů se lze jen dohadovat, jak zásadně by větší množství glukózy ovlivnilo množství MK u *C. capitatum*. Vyšší zastoupení MK v biomase je ovšem rozhodně žádoucí, usnadňuje extrakční krok a eliminuje množství odpadu vyprodukovaného na jednotkové množství produktu.

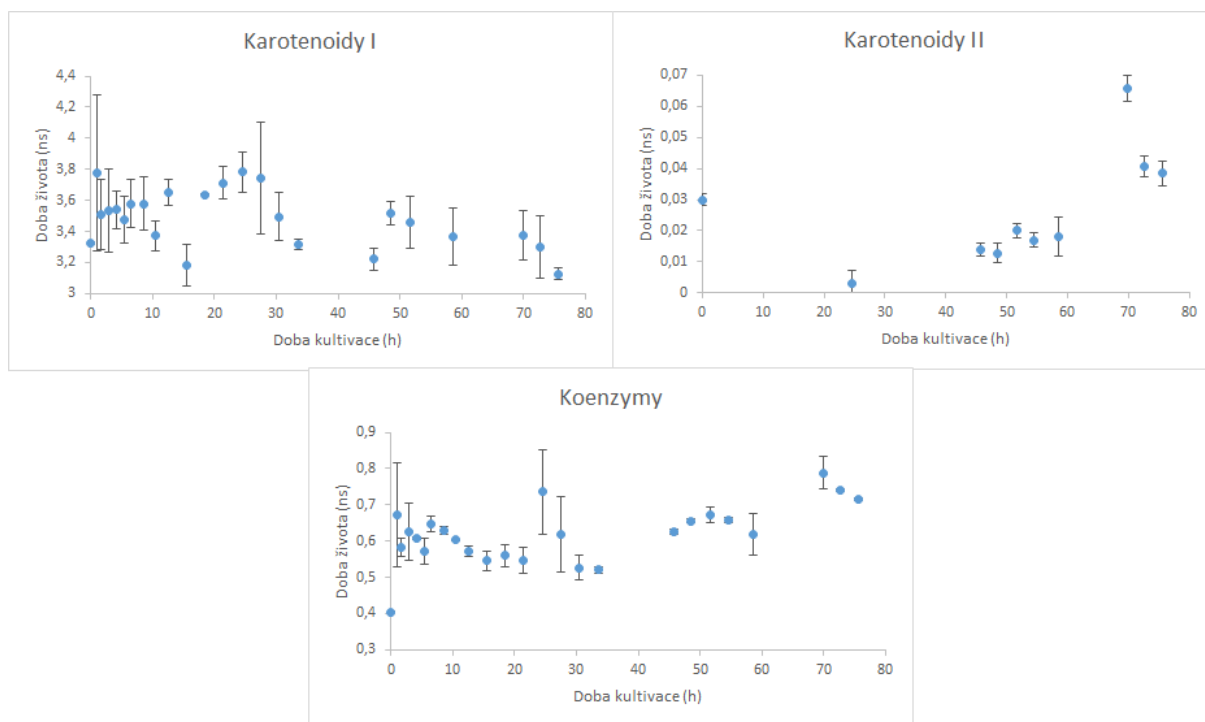
Také stojí za zvážení, zdali větší množství glukózy nevedlo jen ke stimulaci růstu, zatímco akumulace metabolitů nebyla tomu proporcionálně zvýšena – tomu by se dalo předejít změnou strategie přísunu substrátu z batch na fed-batch.



Graf 58: Zastoupení mastných kyselin při kultivaci *C. macerans*

5.6.3 FLIM snímkování *C. macerans* v průběhu fermentace

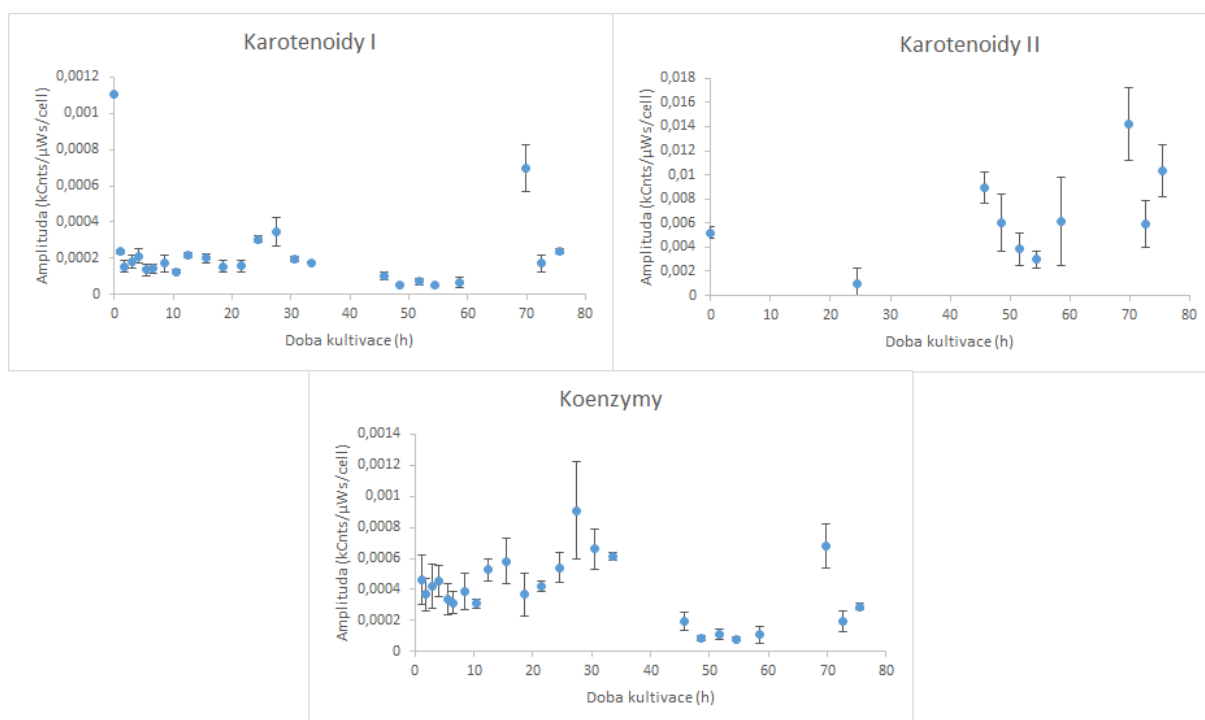
Přehled dob života na Graf 59 ukazuje v případě membránové formy Karotenoidy I postupný nárůst od hodnot 3,5 až k 3,8 ns v 28 h. Poté, v čase obdobném změně režimu spotřeby glukózy, dochází k razantnímu poklesu doby života tohoto času, tedy k určitému rozvolnění a zprůchodnění membrán – lze to vnímat jako snahu buňky učinit zbývající, nižší koncentraci glukózy dostupnější. Od 33 h se jeví doba života Karotenoidů I zhruba konstantní s hodnotou okolo 3,4 ns.



Graf 59: Graf dob života jednotlivých fluoreskujících specií v průběhu kultivace *C. macerans*

Granulová forma karotenoidů (Karotenoidy II) není v průběhu první poloviny fermentorové kultivace vůbec zachycena. Od 45h však je přítomna setrvale a její doba života vzrůstá, což naznačuje určité zhutnění obsahu granulí a snížení viskozity. Za zmínku pochopitelně stojí, že se Karotenoidy II objevují před tím, než dochází ke změně v nárůstu množství lipidů, konkrétně tedy ke zrychlení jejich akumulace.

Velmi zajímavý je pohled na vývoj doby života koenzymů. Zpočátku je hodnota asi konstantní (jsou zde velké chybové úsečky) okolo 0,6 ns (Graf 60). Po 6,5 h však zřetelně klesá, i když tento pokles vede jen ke snížení na 0,55 ns, kterážto hodnota je udržována mezi 15-22 h. Poté dochází k prudkému navýšení doby života, tedy výraznému odchýlení poměru NAD/NADH ve prospěch oxidované formy. Tento stav odezní až s 30. hodinou (s přechodem do jiného režimu spotřeby glukózy), od kdy je opět udržována hodnota okolo 0,55 ns. Během druhé noci kultivační došlo opět k nárůstu doby života a tedy odchýlení metabolismu ve prospěch oxidačních dějů. Tento stav je překvapivě udržován až do konce kultivace, zatímco evidentně probíhá intenzivní syntéza zásobních triacylglycerolů (viz diskuze výše).

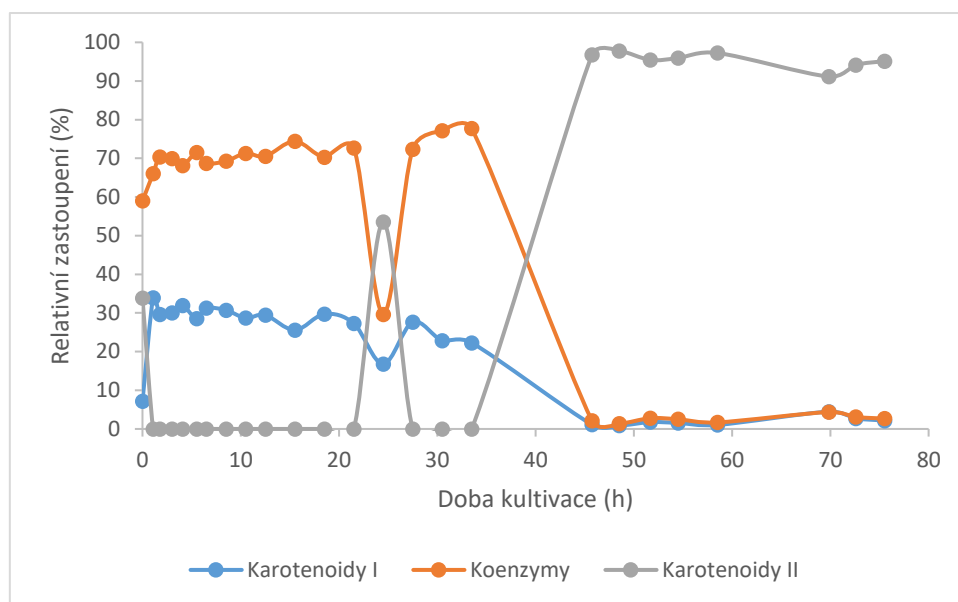


Graf 60: Amplitudy jednotlivých specií v průběhu kultivace *C. macerans*

Graf časového vývoje amplitud (Graf 60) ukazuje na především na zvýšení koncentrace membránových karotenoidů a koenzymů v době před 30 h. Karotenoidy I od počátku kultivace vykazují vyrovnané amplitudy, které se zvedají právě až před 25 h, drží se vysoko ještě u vzorku z 28 h. Po 30 h amplituda klesá až na hodnoty zhruba 40% vůči hodnotám z počátku kultivace. Na základě měření zde setrvávají mezi 45-60 h. Až poté se amplituda zvyšuje, na konci dosahuje hodnot přibližně shodných s počátečními. Je tedy zjevné, že na přírůstku karotenoidů (Graf 52) po 50 h nemá membránová forma příliš velký podíl.

Amplituda pro Karotenoidy II je zpočátku kultivace nulová, tato forma vůbec nebyla zaznamenána (kromě samotného inokula). Teprve ve 25 h se objevuje první záznam, ale teprve po 45 h je tato forma nalézána ve vzorcích pravidelně a bez výjimky. Lze se domnívat, že v období mezi 30 a 45 h (druhá kultivační noc) průběžně narůstalo množství karotenoidů v granulích. Po 45 h amplitudy klesají a až po 55 h opět výrazně stoupají. K tomuto poklesu lze nalézt v čase odpovídající pokles (fluktuaci) v množství karotenoidů (Graf 52). Vzestup amplitudy po 55 h pak koreluje s vzestupem množství karotenoidů, ovšem k poklesu amplitud na konci kultivace nelze nalézt odpovídající pokles množství karotenoidů – na to není dost dat z HPLC analýzy vzorků z konce kultivace.

Amplituda koenzymů v tomto případě velmi přesně kopíruje průběh Karotenoidů I, jen s tím, že množství membránových karotenoidů je po celou dobu zhruba poloviční. Charakteristické tedy je, že ještě předtím, než dojde k přepnutí režimu konzumace glukózy, dochází ke zvýšení amplitudy, tedy i koncentrace koenzymů. Zároveň zvýšení doby života ukazuje na vyšší zastoupení oxidované formy, tedy metabolismus spíše nastavený na oxidační reakce. Tomu odpovídá, že následně po přepnutí je syntéza karotenoidů dosti potlačena a syntéza MK je mírná. Zatímco doba života koenzymů se rychle vrátila na původní hladinu, amplituda postupně poklesla na méně než poloviční hodnoty, než byla počáteční a zřejmě již nijak podstatněji nestoupala až do konce kultivace.



Graf 61: Relativní zastoupení fluoreskujících spécií v průběhu kultivace *C. macerans*

Graf relativního zastoupení (Graf 61) ukazuje již výše zmíněné přibližně dvojnásobné množství koenzymů oproti membránovým karotenoidům. S nástupem granulární formy dochází v zásadní změně v zastoupení, tato forma zcela dominuje.

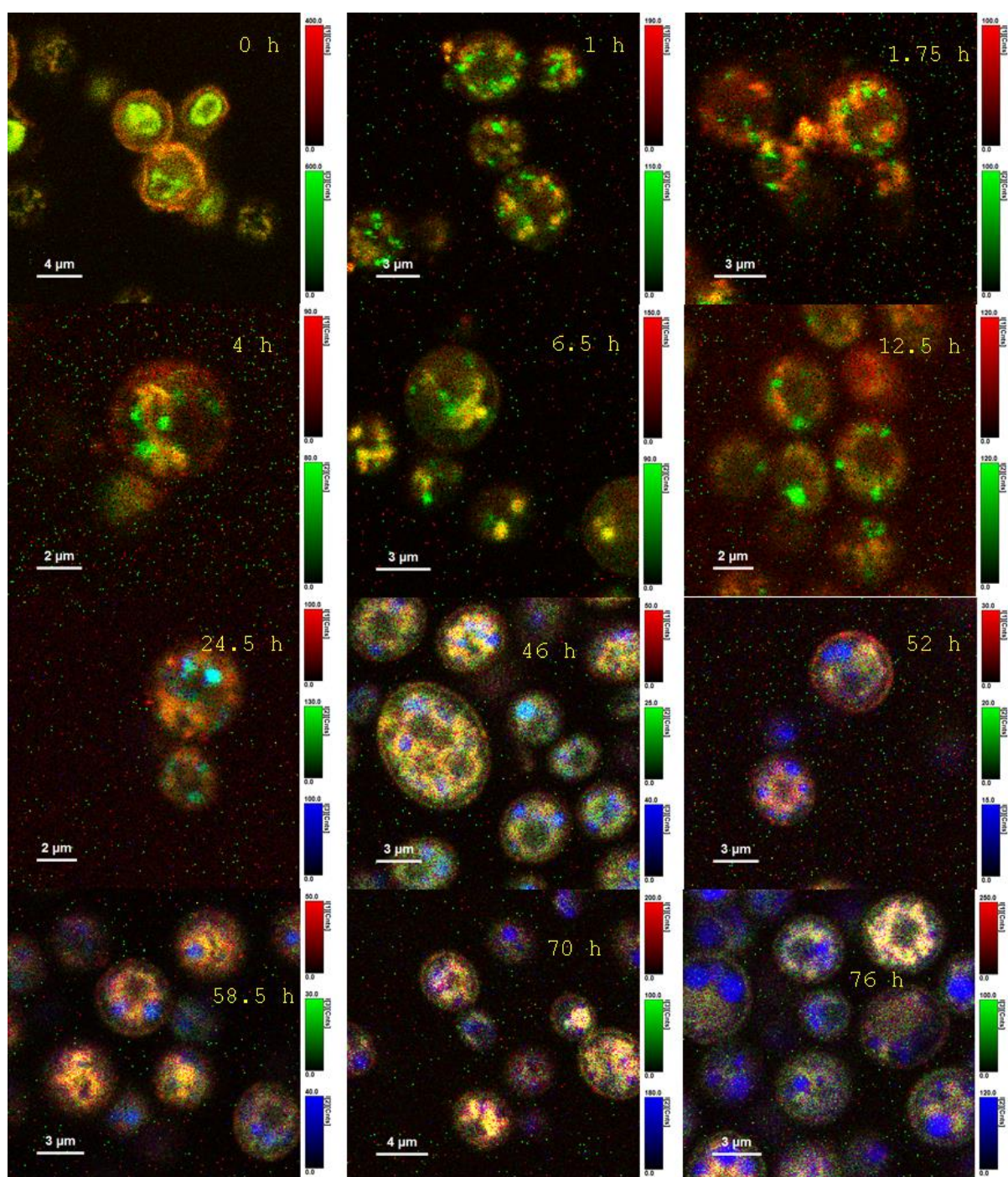
Snímky *C. macerans* uvedené na následující straně (Obrázek 15) ukazují výše zmíněný vývoj v podobě změn morfologie buňky a jejich vnitřních komponent. Pro tři fluoreskující spécie je zavedena tzv. „false-colour representation“: červeně jsou uvedeny Karotenoidy I, zeleně koenzymy a modře Karotenoidy II. Na počátku kultivace nejsou v obrázcích zachyceny Karotenoidy II, protože se v buňkách nevyskytovaly (viz výše).

První snímek (0 h) představuje inokulum. Nutno poznamenat, že vzhledem k selhání klimatizace v laboratoři byla inokulační kultura kultivována za vyšší teploty ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$), čemuž i odpovídá stresová morfologie. Koenzymy jsou zde lokalizovány především do endoplazmatického retikula, dále jsou lokalizovány i poblíž cytoplazmatické membrány.

Už hodinu po inokulaci do fermentoru, tedy v době, kdy započal pokles redoxního potenciálu v médiu, je signál Karotenoidů I z membrán poněkud zeslabený. Také lze vidět lipidické granule, na jejichž povrchu je vysoká koncentrace koenzymů. Žluté oblasti uvnitř buněk ukazují na membránové intracelulární útvary (Golgiho systém, endoplazmatické retikulum...), ve kterých se současně vyskytují karotenoidy i koenzymy. V buňkách začínají být velká černá místa – nefluoreskující jádra a vakuoly. Tento stav s různými proměnami přetrvává do té doby, až se ve 24,5 h v lipidických granulích poprvé spolu s koenzymy objevují karotenoidy (tyrkysová barva). Už u tohoto vzorku lze pozorovat určité „zahuštění“ vnitrobuněčných prostor, projevující se eliminací vakuol, „černých míst“.

V 46 h jsou dobře vidět „zahuštěné“ buňky, mnohé lipidické granule jsou čistě modré (koncentrace karotenoidů zde zcela převážila množství koenzymů), u mnohých buněk začíná být opět zřetelná cytoplazmatická membrána. Lze vidět mnohé vnitrobuněčné membránové systémy, ve kterých se nacházejí pospolu karotenoidy i koenzymy. Tento stav postupuje až do konce kultivace spolu se silnou syntézou karotenoidů a lipidů. Na konci lze rozeznat dvě populace buněk – ty, ve kterých je fluorescence dominantně dána lipidickými granulemi, a ty,

kde jsou výrazné intracelulární membránové systémy.



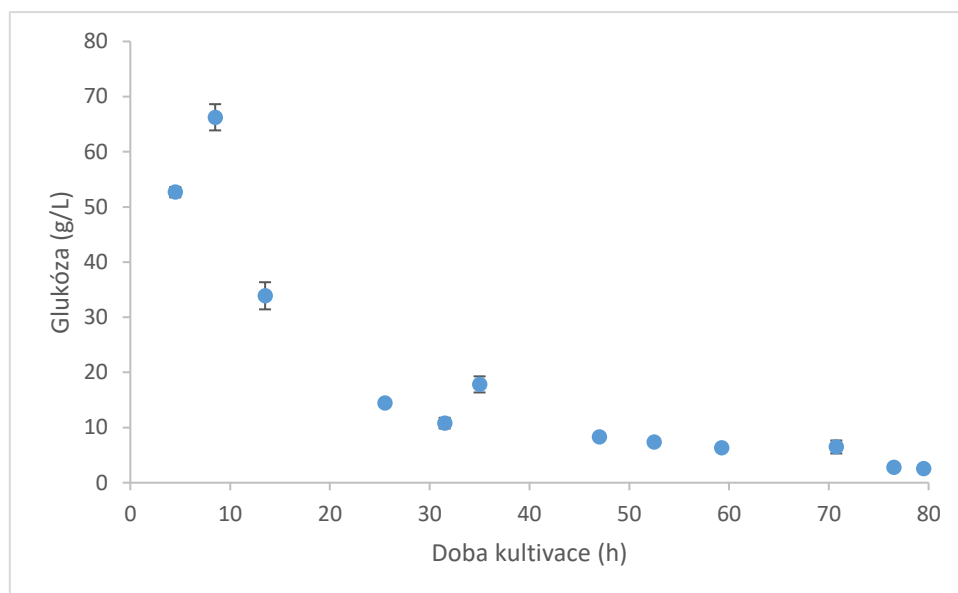
Obrázek 15: *Cytofilobasidium macerans* v průběhu kultivace, snímky získané pomocí FLIM. Použita false-colour representation: červeně jsou uvedeny Karotenoidy I, zeleně koenzymy a modře Karotenoidy II.

5.7 Fermentorová kultivace *Sporobolomyces shibatanus*

Kultivace kmene *S.shibatanus* byla provedena dle kap. 4.8 . Krátce po začátku fermentace bylo zjištěno, že ethernetový konektor mezi fermentorem a počítačem, který slouží pro záznam dat, nebyl funkční, z toho důvodu chybí on-line zaznamenávaná data spotřeby báze a kyseliny, koncentrace rozpuštěného kyslíku, turbidita, míchání a další.

Konec dávkování báze nastal ve 20,5 h. Ve 29,5 h bylo omylem zastaveno vzdušnění. Shodou okolností to bylo chvíli před pravidelnou kontrolou fermentoru, takže limitace kyslíkem trvala pouhých 20 minut. Nicméně vedla ke spuštění spotřeby báze, která trvala až do konce kultivace v 79,5h. Spotřeba za toto období byla velmi pozvolná a nízká (24 ml).

Na Graf 62 je vidět spotřeba glukózy v průběhu fermentace (dle kap. 4.14). Když budou opomenuty hodnoty z 8,5 a 35 h, lze vidět, že profil je opět (jako u CM, viz Graf 43) složen z období rychlé, ale nakonec zpomalující konzumace, následované (po 30 h) režimem lineární spotřeby.

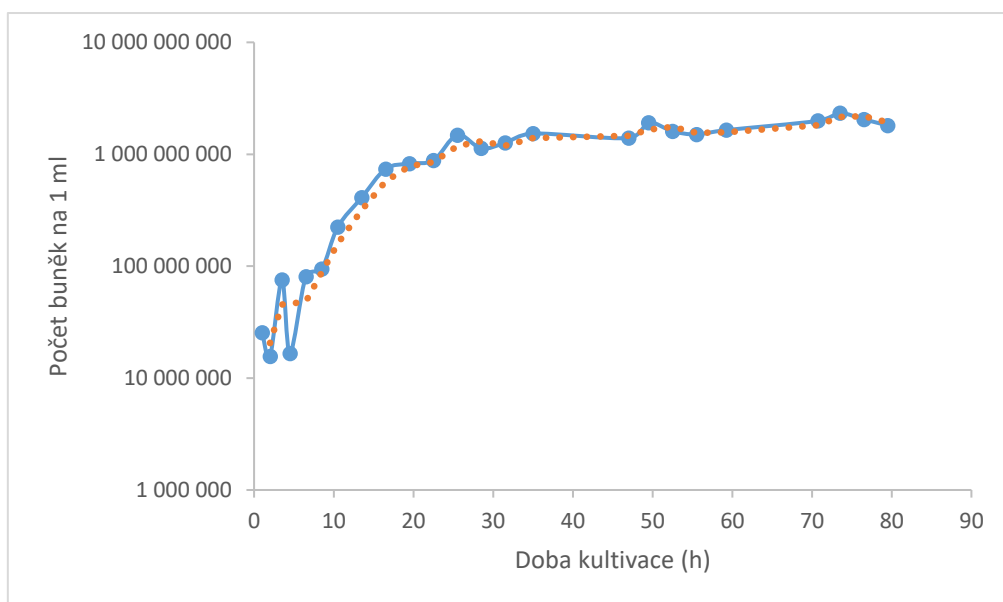


Graf 62: Spotřeba glukózy v průběhu kultivace *S. shibatanus* ve fermentoru

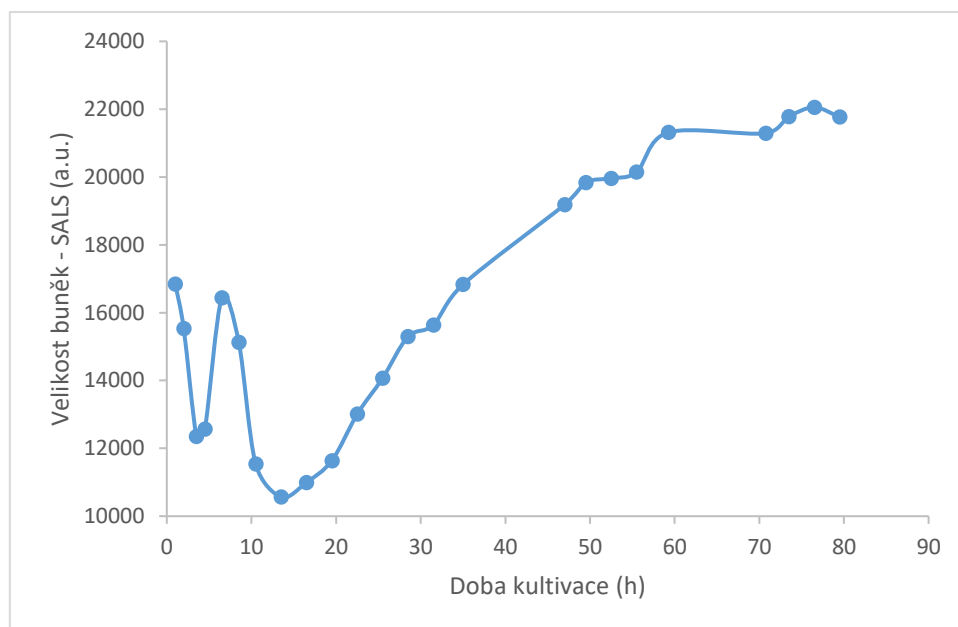
5.7.1 Průtoková cytometrie v průběhu kultivace *S. shibatanus*

Následující sekce bude věnována cytometrickým analýzám (viz kap. 4.9) vzorků odebíraných v průběhu fermentace *S. shibatanus*.

Na Graf 63 lze vidět, finální koncentrace buněk byla přibližně stejná jako u CM (srov. Graf 45). I průběh je docela podobný, ovšem zde je přechod mezi exponenciální fází a fází zpomaleného růstu pozvolnější a je, zdá se, posunut až k 16 h (vs 10 h u CM). Stejně jako u CM je i u *S. shibatanus* (dále i SS) na počátku vidět kolísavá stagnace, která je pravděpodobně inherentním problémem při měření kvasinek pomocí průtokové cytometrie (viz hypotéza v kapitole 5.6.1 , str. 72).

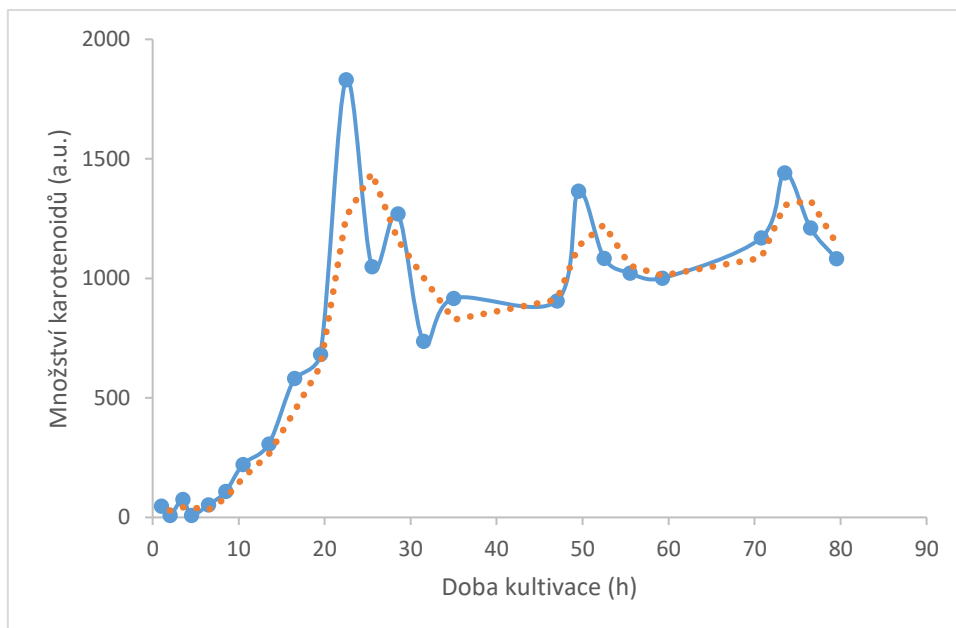


Graf 63: Vývoj počtu buněk v průběhu fermentorové kultivace *S. shibatanus*

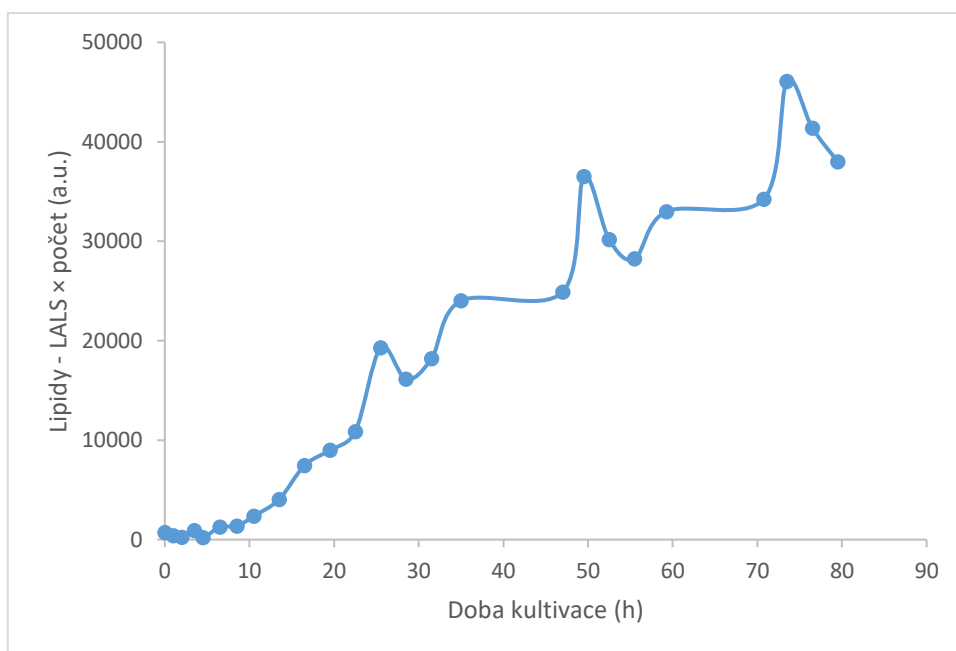


Graf 64: Změna velikosti buněk, dle rozptylu světla při průtokové cytometrii

Pomocí průtokového cytometru odhadnutá velikost buněk (Graf 64) ukazuje v první řadě na menší velikost buněk SS oproti CM, tedy i oproti CC. To je v souladu s mikroskopickými pozorováními, kdy buňky rodu *Sporobolomyces* jsou menší než je u ostatních karotenogenních kvasinek obvyklé. Pro porovnání CM mělo na počátku lehce pod 30 000 a.u., v minimu okolo 11 000 a.u. a na konci kultivace necelých 40 000 a.u., zatímco u SS jsou čísla následující: 17 000 – 10 500 – 22 000 a.u. Velikostí nejbližší jsou si buňky tedy zhruba na vrcholu exponenciální fáze. U CC jsou hodnoty na vrcholu exponenciální fáze okolo 24 000 a.u., je ovšem otázkou, nakolik je tato vyšší hodnota dána odlišnou počáteční koncentrací glukózy a nakolik vlastnostmi CC.



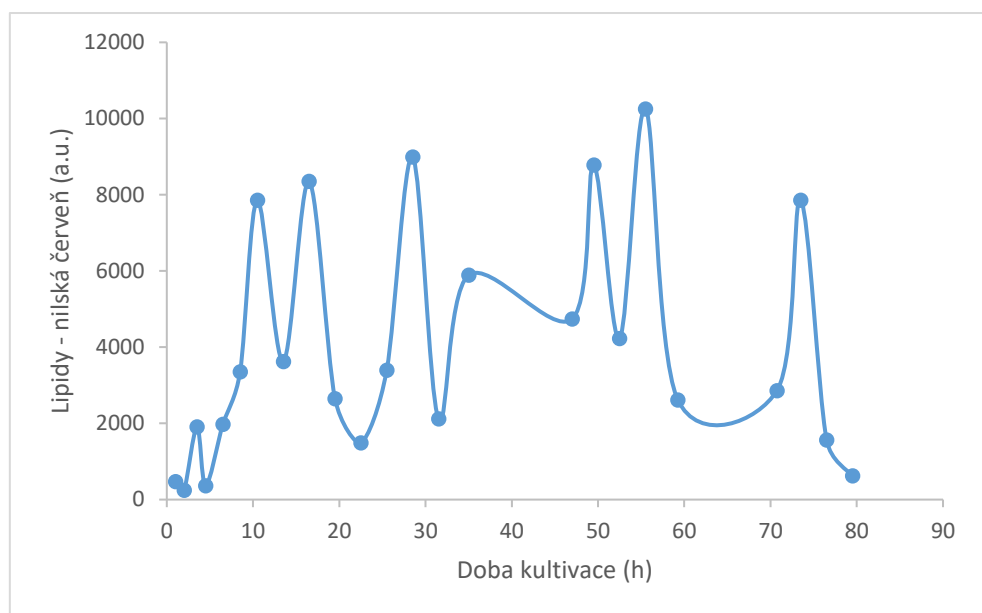
Graf 65: Obsah karotenoidů dle autofluorescence *S. shibatanus* při 590 nm



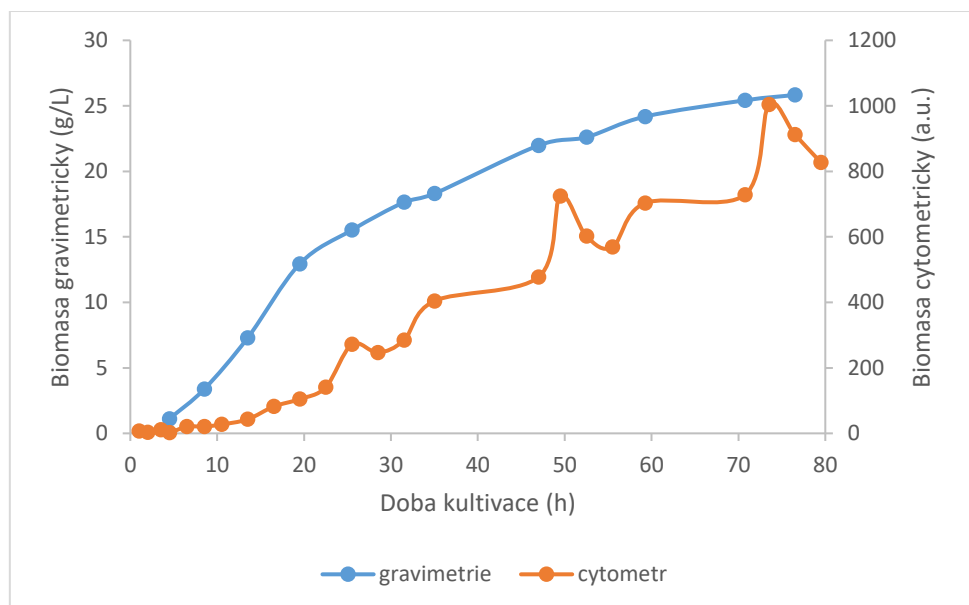
Graf 66: Odhad množství lipidů *S. shibatanus* pomocí bočního rozptylu světla

Obsah karotenoidů stanovený pomocí cytometrie (Graf 65) jeví obdobný průběh jako u předchozích dvou fermentací – před 30 h je dosaženo určitého maxima, následuje pokles, do konce kultivace je pak množství zhruba konstantní či jen mírně stoupá

Průtokově-cytometrické stanovení lipidů je obdobné jako v předchozích dvou případech – metoda využívající Nilskou červeň je zcela nevhodná (Graf 67 níže), zatímco metoda používající boční rozptyl a počet buněk (Graf 66) ukazuje na nárůst množství od asi 10 h, který v průběhu času postupně zpomaluje. U SS jsou zásobní lipidy obdobné jako u CM – a na rozdíl od CC – skladovány ve větším počtu menších zásobních granulí.

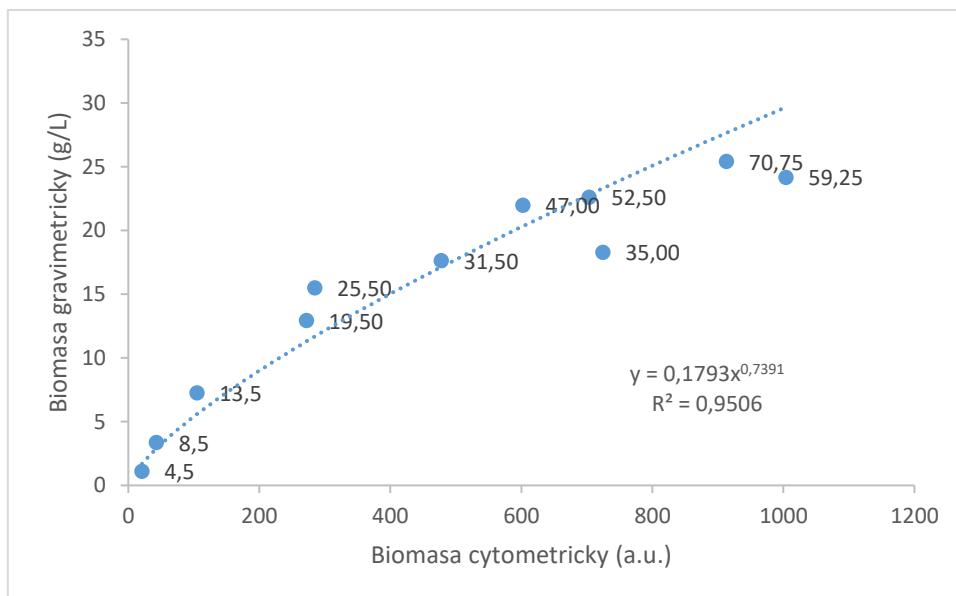


Graf 67: Odhad množství lipidů získaný barvením buněk *S. shibatanus* Nilskou červí



Graf 68: Porovnání průtokově-cytometrického stanovení biomasy s gravimetrickým stanovením, pro *S. shibatanus*

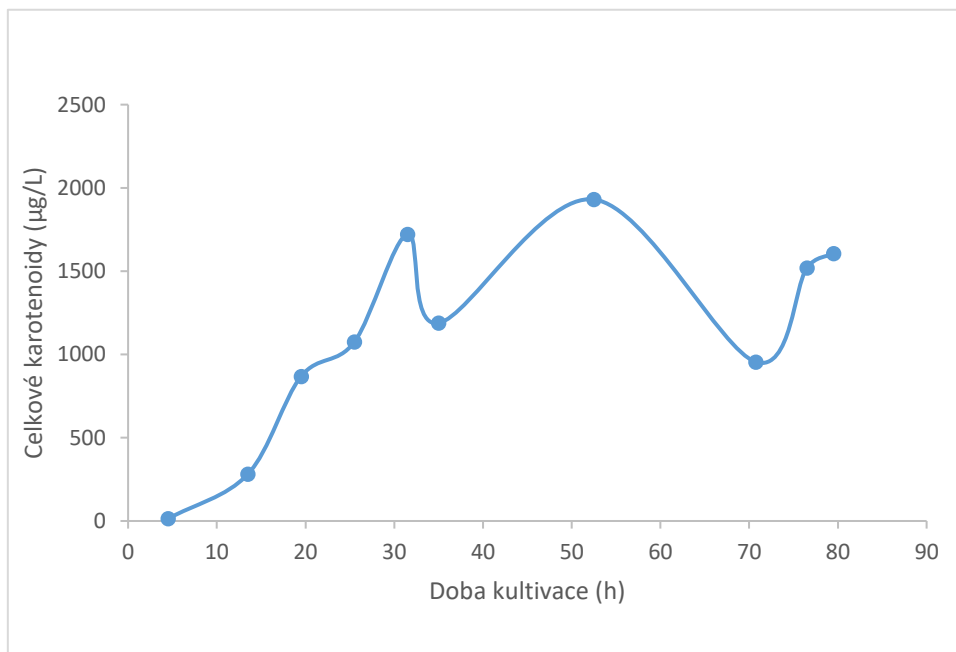
Graf 68 uvádí porovnání mezi cytometricky odhadnutou a gravimetricky stanovenou biomasou. Obdobně jako u CM je zde problém rozkolísanosti cytometrické „křivky“ a také rozdíl v konvexnosti/konkávnosti. Byly tedy vůči sobě vyneseny hodnoty cytometrické a gravimetrické a proloženy mocninnou funkcí v MS Excel. Lze vidět diametrální změnu hodnot koeficientů – od hodnot přibližně rovných jedné polovině (u CM) je zcela odlišným. To může být způsobeno odlišným charakterem buněk – např. SS jsou menší, přitom jsou obdobně naplněny větším množstvím menších granulí, takže mají větší podíl lipidů v biomase (srovnej Graf 57 a Graf 75).



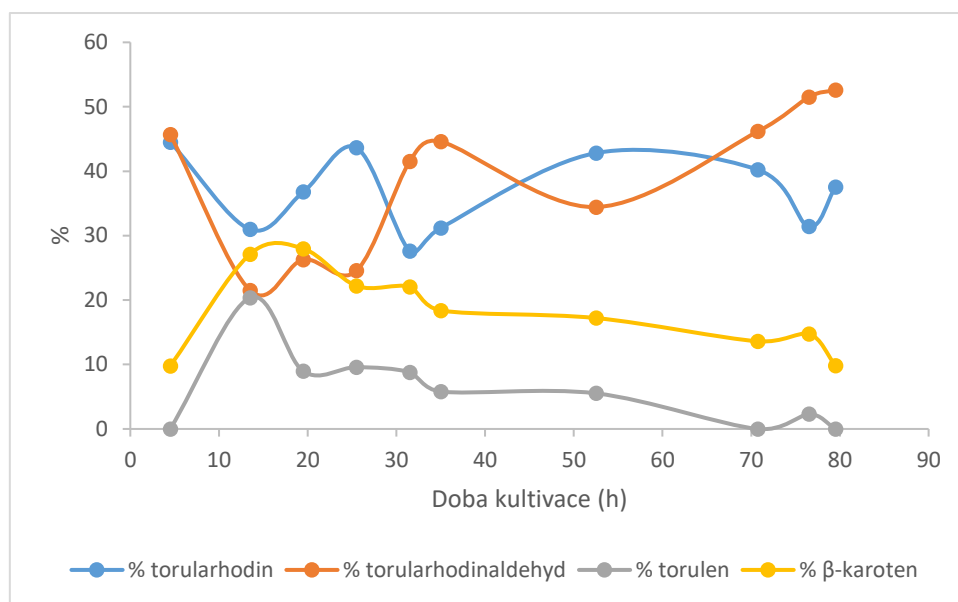
Graf 69: Závislost mezi cytometrickým a gravimetrickým stanovením biomasy *S. shibatanus*

5.7.2 Stanovení karotenoidů pomocí HPLC, stanovení mastných kyselin pomocí GC a porovnání s časovými profily získanými pomocí průtokového cytometru

Časový profil množství karotenoidů v Graf 70 není příliš odlišný od průběhu uvedeného v Graf 65 získaném pomocí průtokové cytometrie. To ukazuje na první zřetelnou a významnější shodu mezi klasickým HPLC stanovením karotenoidů a jejich autofluorescence stanovené průtokovou cytometrií. Vzhledem k pochybnostem zjištěným při měřeních na zástupcích rodu *Cystofilobasidium* je nutné jakékoli další závěry podložit opakováním měření, jakkoliv mohou být časově náročná.

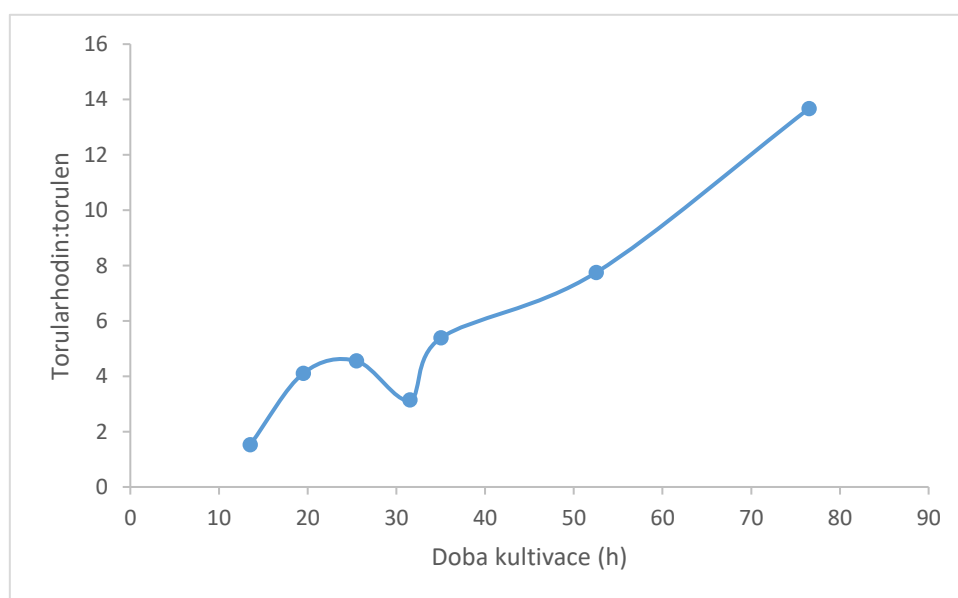


Graf 70: Množství lipidů stanovené po Folchově extrakci vzorku suspenze *S. shibatanus* pomocí HPLC



Graf 71: Relativní zastoupení karotenoidů v průběhu kultivace *S. shibatanus*

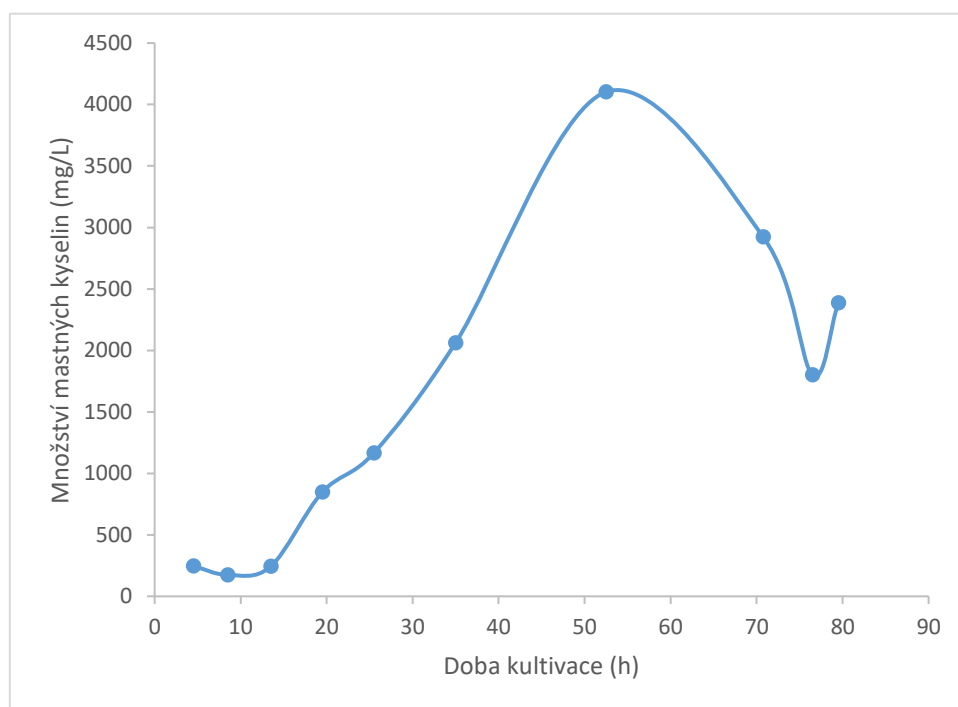
Zastoupení jednotlivých karotenoidů má mnohem blíže distribuci pigmentů u CC nežli u CM, u kterého zcela dominoval torularhodin. Namísto vyrovnaného poměru torularhodin:torulen, jako tomu bylo u CC, zde dominuje obdobně zastoupená dvojice torularhodin:torularhodinaldehyd. Relativní zastoupení torulenu a β-karotenu v průběhu fermentace zjevně klesá, za daných kultivačních podmínek je u SS zjevně upřednostňována syntéza torularhodinu a torularhodinaldehydu, v případě torularhodinaldehydu relativní zastoupení vzrůstá.



Graf 72: Poměr torularhodinu a torulenu v průběhu kultivace *S. shibatanus*

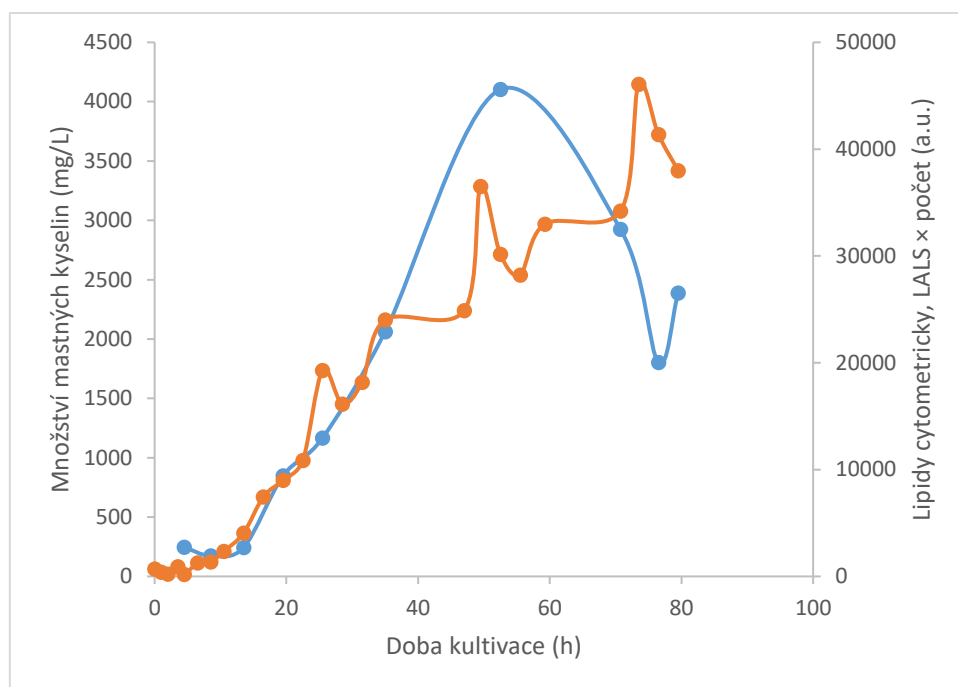
Poměr torularhodinu a torulenu, který byl zkoumán i v minulých fermentacích, má v tomto případě jednoznačně vzestupný charakter (s výjimkou vzorku z 31,5 h), daný především setrvalým poklesem relativního obsahu torulenu. Pokles vzájemného poměru okolo 30 h nemusí být náhodný (resp. způsobený chybou), ale může se pojít s metabolickým posunem,

spojeným mimo jiné se změnou režimu konzumace glukózy.



Graf 73: Množství mastných kyselin v průběhu kultivace

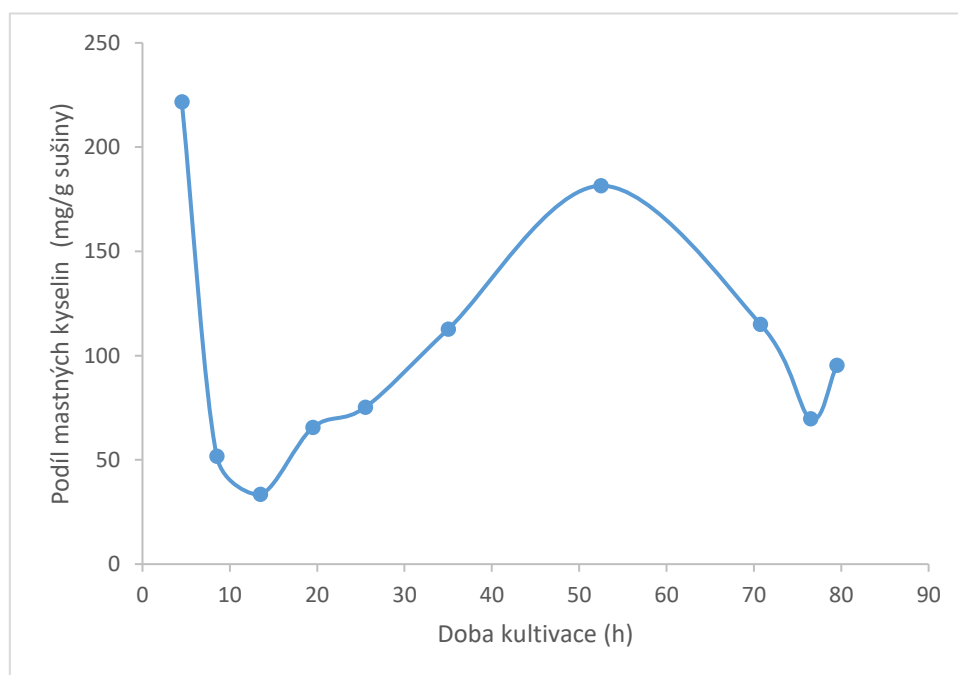
Množství vyprodukovaných mastných kyselin od 12 h do 52,5 h stoupá prakticky lineárně (Graf 73). Poté, zřejmě v důsledku konzumace zásobních lipidů množství izolovatelných lipidů klesá. Rychlejší dosažení maxima, resp. hodnot okolo 4 g/L MK než u CM je jednoznačnou výhodou SS, pokud jde o produkci lipidů. Ovšem porovnáme-li SS s CC, pak zjistíme, že CC bylo za shodný čas schopné akumulovat o 0,4 g/L, tj. o 10 %, více mastných kyselin, a to při polovičním množství dostupné glukózy. Z hlediska produkce lipidů tedy ze zkoumaných druhů (již předtím selektovaných na základě předchozí zkušenosti s produkčními schopnostmi) je nejlepším a perspektivním producentem *Cystofilobasidium capitatum*.



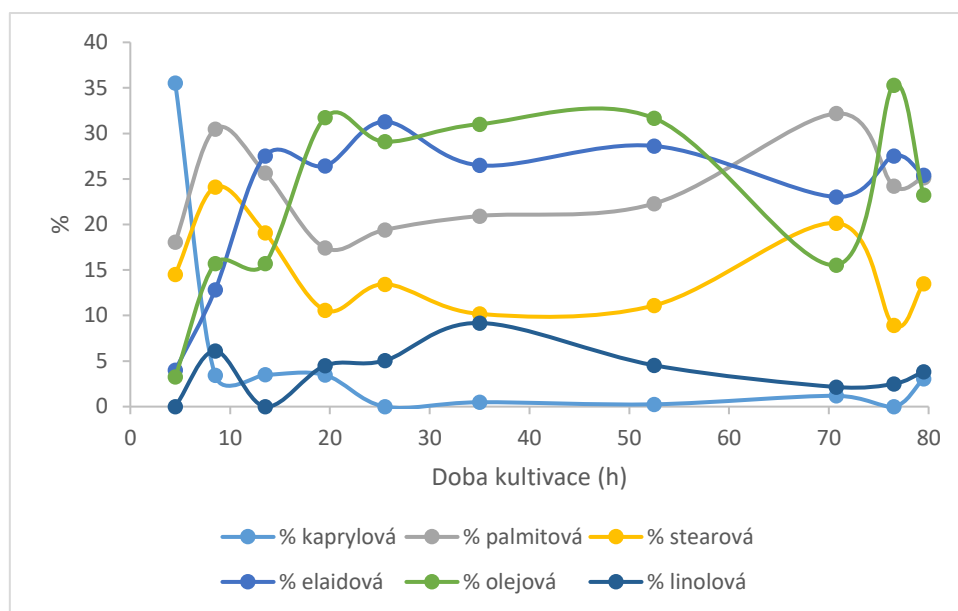
Graf 74: Porovnání GC a cytometrického (rozptylová metoda) stanovení lipidů

Na Graf 74 je uvedeno porovnání mezi klasickou GC-FID metodou stanovení MK a stanovením lipidů pomocí rozptylu světla na průtokovém cytometru. Je zřejmé, že cytometrická metoda je zcela nevhodná k záznamu úbytku lipidů v pozdní fázi fermentace, obdobně jako tomu bylo v případě fermentace CC.

Relativní zastoupení lipidů na hmotnosti biomasy (Graf 75) nenabízí nic neobvyklého – zpočátku, tedy v průběhu exponenciální fáze množení buněk podíl lipidů (reprezentovaných především MK) prudce poklesl, poté postupně vzrůstá, avšak po 50 h dochází k přepnutí metabolismu na spotřebu zásobních lipidů, takže jejich podíl na biomase klesá.



Graf 75: Podíl mastných kyselin na sušině *S. shibatanus*



Graf 76: Zastoupení jednotlivých mastných kyselin v průběhu kultivace *S. shibatanus*

Zastoupení jednotlivých MK (Graf 76) ukazuje na dominující postavení olejové a elaidové kyseliny (trans izomer ke kyselině olejové), které dohromady mají něco přes 60 % z celkového množství MK (s výjimkou počátečních vzorků). O něco méně je zastoupena palmitová a ještě méně stearová kyselina. Lze tedy vidět, že více jsou zastoupeny nenasycené mastné kyseliny. To je rozdíl oproti CC, kde dominovala (nasycená) kyselina kaprylová, u CM je poměr nasycených a nenasycených MK vyrovnaný. Vysoké zastoupení elaidové kyseliny v tucích u SS i CM činí tyto tuky z výživového hlediska nezajímavými.

5.7.3 FLIM snímkování *S. shibatanus* v průběhu fermentace

Vzhledem k selhání závěrky před detektorem třetí den kultivační nemohlo být měření provedeno do až do konce kultivace, poslední proměřený vzorek je tak z 35 h.

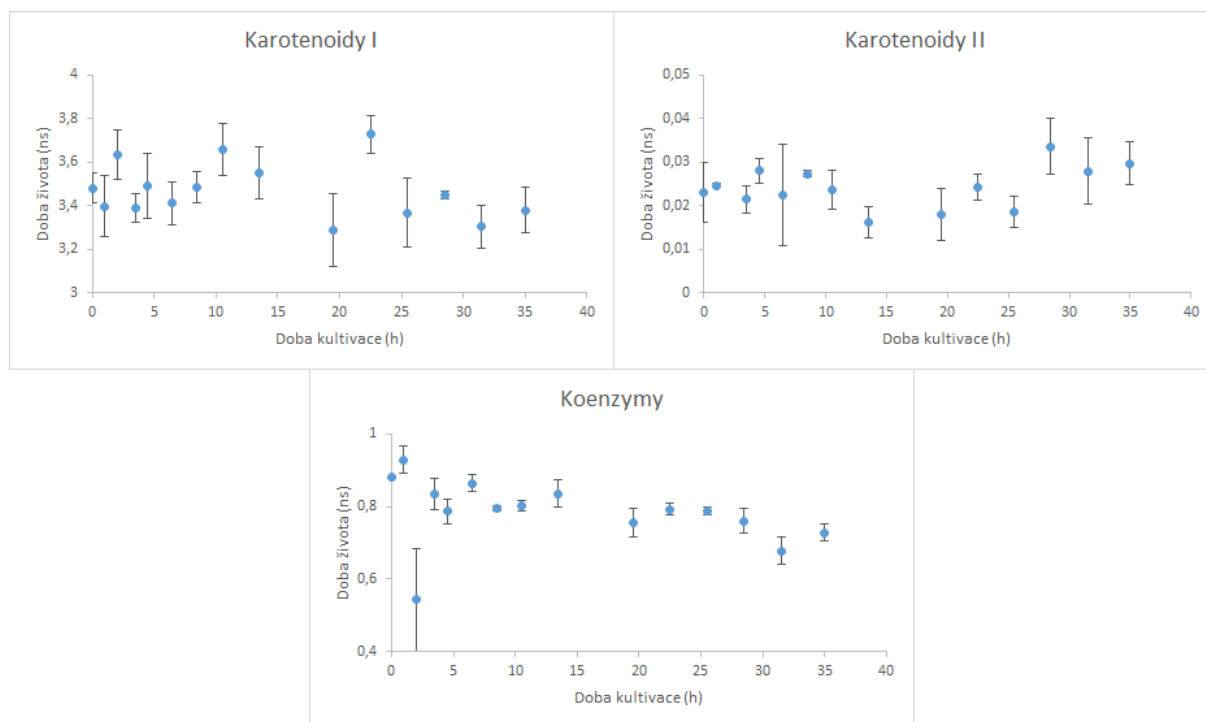
Přehled dob života karotenoidů (Graf 77) ukazuje v případě membránové formy Karotenoidy I, že okolo 10 h kultivace se zvedá doba života. Ta se posléze snižuje cca na počáteční úroveň, kde setrvává až do posledního provedeného měření. Rigidita membrány se tedy během zaznamenané doby příliš neměnila, krátkodobou změnu okolo 10 h si lze spojit s počátkem akumulace lipidů a karotenoidů, také zde zpomaluje pokles velikosti buněk a mění se naopak v trend nárůstu velikosti. Během tohoto přechodného období, kdy už se buňky začínají připravovat na stacionární fázi a aktivují syntézu zásobních látek, dochází ke zvýšení rigidity membrán, což lze považovat za snahu ochránit vnitrobuněčný obsah během klíčového metabolického posunu.

Zajímavý je vývoj doby života granulární formy karotenoidů. Změny jsou velmi malé, nicméně přece jen zřetelné. Do cca 6 h dochází k nárůstu doby života, tedy zvyšování rigidity granulí – toto snad lze nahlížet jako na proces „zahušťování“ obsahu granulí, kdy jsou z nich odčerpávány triacylglyceroly jako zdroj energie pro metabolismus v průběhu množení buněk. V granulích tak zůstává jen malé množství triacylglycerolů a především sterylestery. Posléze dochází k poklesu doby života s tím, jak se postupně spouští syntéza MK. Mezi 14 a 20 h doba života dosahuje určitého minima, aby pak opět rostla až nad úroveň dosaženou okolo 6 h – tato je dosažena před 30 h a posléze až do 35 h je udržována. Okolo 30 h dochází

k přechodu na lineární režim spotřeby (zbytkové) glukózy, tato změna je se změnou charakteru granulí zřejmě spojena – s omezenější dostupností glukózy se granule „zahušťují“ sterylestery, s přechodem do nedostatkového režimu je pak vzájemný poměr syntézy sterylesterů a triacylglycerolů udržován tak, že viskozita granulí zůstává konstantní (alespoň v průběhu oněch pěti hodin).

Doba života koenzymů souhrnně klesá, ovšem mezi 5-25 hodin ji lze považovat za konstantní, klesá tedy především před a po tomto časovém intervalu. Obecně je doba života velmi vysoko, což nasvědčuje na velmi intenzivní katabolismus.

Pátou hodinu lze orientačně spojit s přechodem na křivce počtu buněk, kdy se stagnace mění ve zřejmý růst (stále ale nezapomínejme na specifika cytometrie kvasinek v rané fázi vývoje kultury) – tedy s množením kultury. Počáteční pokles lze tedy interpretovat jako změnu v průběhu lag fáze, kdy buňka přechází z režimu, kdy především jen hojně využívala na živiny bohaté prostředí, do režimu, ve kterém se metabolismus orientuje na množení. V takovém stavu je hojnost NADH, roste tak syntetická aktivita, což lze detekovat právě poklesem doby života koenzymů. Období 5-25 h pak odpovídá určitému stabilnímu stavu, po 25 h opět dochází ke snížení doby života. Tehdy se postupně schyluje v důsledku vyčerpávání uhlíkatého zdroje k změně režimu konzumace glukózy (viz výše) a především vzrůstá rychlost syntézy MK (viz Graf 73).

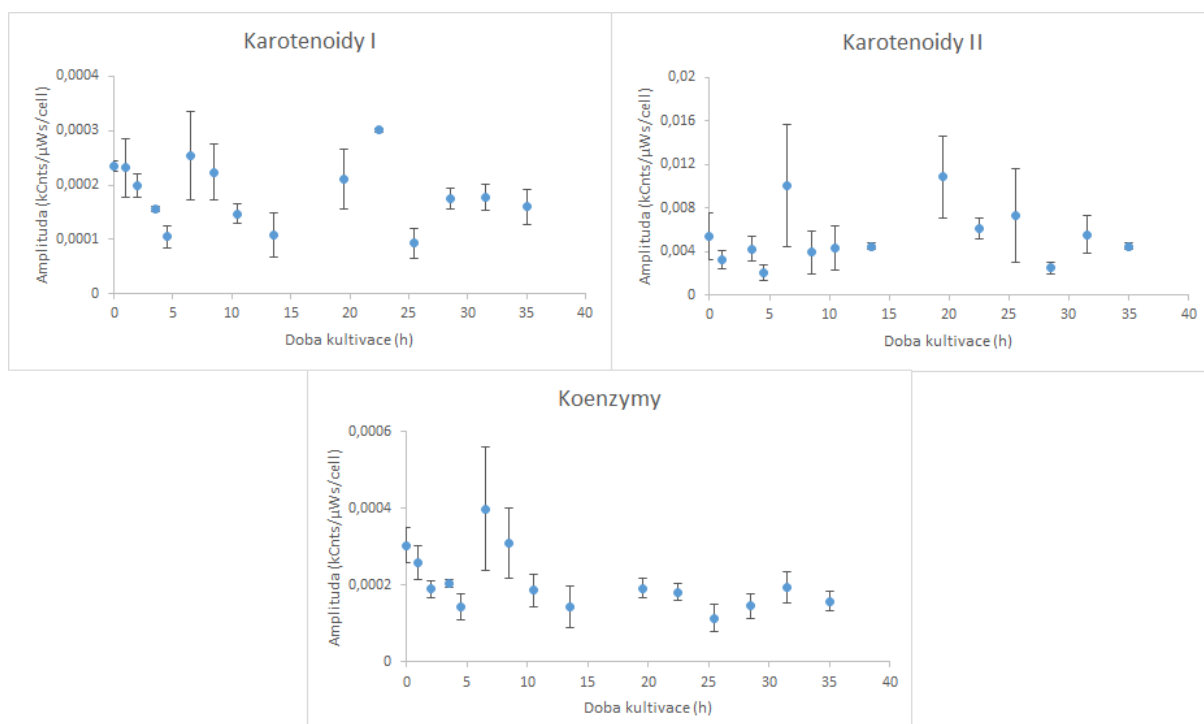


Graf 77: Vývoj dob života při kultivaci *S. shibatanus*

Co se amplitud a tedy i buněčných koncentrací týče (Graf 78), lze v případě Karotenoidů I vidět, že s počátkem kultivace a přechodem z lag fáze do exponenciální fáze se jednoznačně snižuje množství karotenoidů v membránách – jako by se buňky v prostředí bohatém na živiny neměly potřebu chránit. Nicméně po 5 h množství skokově narůstá až na původní hodnoty (stejně jako je to v případě koenzymů), ale posléze opět klesá (do 15 h), aby do 20 h opět narostlo a pak se do 25 h zase snížilo. Po 25 hodině následuje určitá stabilizace, jež lze

jednoznačně spojit s akumulacním nastavením metabolismu, tedy upřednostněním syntézy MK a karotenoidů před množením buněk. V průběhu záznamu tedy vidíme obdobné oscilace, jako tomu bylo u CC.

Lze tedy v tomto spatřovat jakýsi obecný mechanismus, kdy buňky karotenogenních kvasinek aktivně regulují obsah karotenoidů v buněčné membráně. Na základě časové shody pozorovaných metabolických přechodů/posunů lze pak vyslovit domněnku, že obsah karotenoidů v membránách vzrůstá tehdy, když dochází k metabolickému přepnutí („metabolic switch“), jistému dočasnému pozastavení nebo útlumu metabolismu při inaktivaci určité části enzymového aparátu a aktivaci jiné. Proč je tak nutné se tímto způsobem chránit v obdobích metabolických změn (vzhledem k povaze karotenoidů zřejmě před oxidačním stresem), není dosud jasné. Jednou z možností je, že během těchto změn se vyčerpávají intracelulární (cytoplazmatické) antioxidační mechanismy. Jistou roli může hrát i dříve popsaná zkřížená stresová odpověď pozorovaná u karotenogenních kvasinek a potenciální zapojení karotenoidů v obecné stresové odezvě buněk [8].



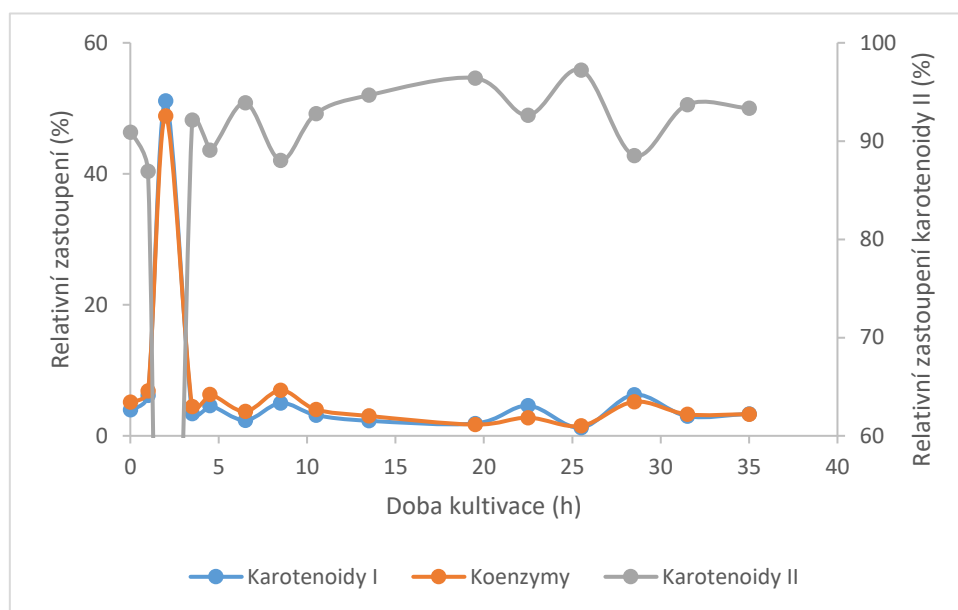
Graf 78: Vývoj amplitud jednotlivých specií v průběhu kultivace *S. shibatanus*

Vývoj amplitud koenzymů dokládá, že jejich změny zásadním způsobem korelují s Karotenoidy I (toto lze vidět i u CM, u CC bohužel není dostatek dat o koenzymech). Tedy když dochází k některému z metabolických přepnutí, dochází k mírnému zvýšení koenzymů dostupných v buňce, což domněnku souvislosti s metabolickými přepnutími ještě podporuje. Lze si snadno představit, jak je syntéza nových enzymů náročná a má-li být adaptace na podmínky prostředí dostatečně rychlá, je žádoucí zvýšit koncentraci složek zajišťujících jejich syntézu.

Množství karotenoidů v granulích (Karotenoidy II) je v průběhu záznamu prakticky konstantní, resp. od 20 h je zde určité – dosti nejisté – navýšení. Hlavní navýšení obsahu karotenoidů v granulích lze očekávat až po 50. hodině (dle analogie s fermentacemi CC

a CM), ovšem pro toto období bohužel chybí záznam.

Relativní zastoupení amplitud (Graf 79) ukazuje na dominantní postavení karotenoidů v granulích prakticky už od počátku kultivace, tak jako tomu bylo u CC (po oscilacích doby života Karotenoidů I a koenzymů tedy další shoda mezi těmito dvěma druhy). V případě SS i CC došlo na počátku kultivace k prudkému propadu relativního zastoupení Karotenoidů II. Vzhledem k časům těchto poklesů si lze představit, že buňky během prvního metabolického posunu nestíhají syntetizovat nové karotenoidy a pouze přesunuly karotenoidy z granulí do membrán.

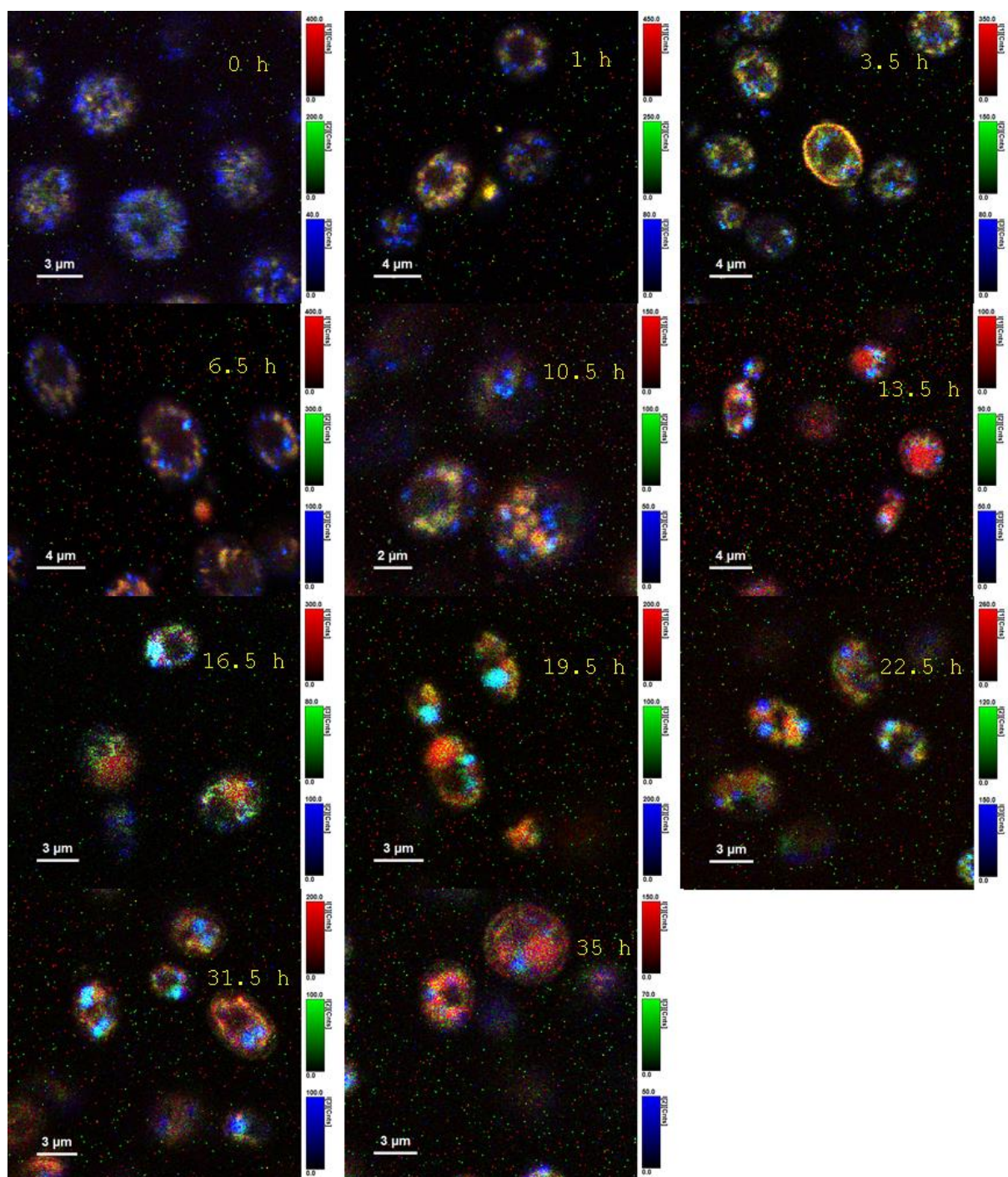


Graf 79: Relativní zastoupení jednotlivých specií při kultivaci *S. shibatanus*

Změny morfologie buňky lze sledovat na FLIM snímcích uvedených na Obrázek 16. Barevné kódování je stejné jako u CM, tedy červená Karotenoidy I, zelená koenzymy a modrá Karotenoidy II. Z výše zmíněného důvodu selhání závěrky před detektorem byl poslední snímek pořízen v 35 h, pozdní stacionární fáze tedy není zaznamenána.

Na počátku kultivace, ve vzorku inokula vidíme situaci přesně opačnou než u CM – je zde spousta drobných lipidických granulí s karotenoidy, cytoplazmatická membrána není zřetelná a vnitrobuněčné membránové systémy jsou zde značně minimalizovány. V průběhu do 10 h lze pozorovat změnu, kdy se snižuje počet granulí v buňce, zato jsou lépe ohraničeny vnitrobuněčné membránové systémy. Snímek z 3,5 h již předeseílá výše zmíněné krátkodobé posílení koncentrace karotenoidů v membránách.

Na snímku z 10,5 h lze vidět v buňkách žluté granule, tedy spíše nějaké kulovité útvary opatřené membránou s karotenoidy a enzymovými systémy využívajícími NAD(P). Tyto útvary, snad vakuoly, se v dalším průběhu kultivace zřejmě shlukují a vytvářejí velké útvary, kde už dominuje červená barva přiřazená Karotenoidům I. A větší počet menších granulí se shlukuje do několika granulí větších, i když zdaleka ne tak velkých jako u CC.



Obrázek 16: *Sporobolomyces shibatanus* v průběhu fermentorové kultivace zobrazené pomocí FLIM. I zde je použita false-colour representation: červeně jsou uvedeny Karotenoidy I, zeleně koenzymy a modře Karotenoidy II

5.8 Shrnutí fermentorových kultivací a zjištěných poznatků

Na prvním místě nyní budou uvedeny zřejmé souvislosti, které byly odhaleny aplikací jednotlivých metod při zkoumání kvasničných buněk v průběhu fermentorových kultivací. Pro přehlednost časového vývoje byly vypracovány tabulky – časové přehledy, které jsou uvedeny v Příloha 1.

U *Cystofilobasidium capitatum* byly nejzřetelnější souvislosti následující:

- Na konci exponenciální fáze došlo k zastavení poklesu amplitudy (tedy koncentrace) membránové formy karotenoidů, stejně jako k zastavení snižování doby života. Buňky tedy začínají zvyšovat rigiditu membrány a zvyšují množství antioxidantů v membránách. Zároveň s tím dochází ke spuštění syntézy zásobních lipidů.
- Krátce po začátku stacionární fáze se spouští syntéza karotenoidů, s tím končí stagnace amplitudy (koncentrace) karotenoidů v lipidických granulích a začíná stoupat, stejně tak končí pokles doby života této formy karotenoidů, tedy začíná se zvyšovat rigidita/viskozita lipidických granulí.
- Před ukončením syntézy lipidů doba života granulární formy karotenoidů několik hodin stagnuje, je tedy udržován určitý stav granulí příznivý pro syntézu mastných kyselin. Po ustání syntézy se načas zvedá viskozita granulí, což odpovídá výraznému píku v časovém průběhu doby života.

Pro *Cystofilobasidium macerans*:

- Během zdánlivé stagnace počtu buněk a následné exponenciální fáze došlo k poklesu amplitud koenzymů, což by mohlo být interpretováno jako určité naředění, spojené s nedostatečnou syntetickou aktivitou. S přechodem do fáze zpomalujícího množení amplituda koenzymů začíná vzrůstat.
- Amplituda membránové formy karotenoidů vytváří pík v okolí minima velikosti buněk, s maximem umístěným právě v bodě s nejmenší velikostí buněk. Lze tak uvažovat o více méně konstantním množství membránových karotenoidů, zatímco jejich vnitrobuněčná koncentrace se zvyšovala z důvodu poklesu velikosti buněk, tedy i jejich objemu, stejně jako plochy cytoplazmatických membrán.
- S koncem režimu rychlé nelineární konzumace glukózy se dostavuje zastavení poklesu doby života koenzymů, tedy začíná docházet k přeorientování metabolismu na akumulaci zásobních látek. Záhy je z dat GC zřejmé, že započala syntéza zásobních lipidů.
- Konec množení buněk zde v čase souvisí s mnoha dalšími událostmi, jako je konec režimu zpomalující spotřeby glukózy (dále je spotřeba lineární), konec lineárního režimu dávkování báze a také dochází k poklesu otáček (nižší nároky na spotřebu kyslíku). Dále dochází ke stabilizaci množství karotenoidů, končí dosavadní vzestup amplitudy koenzymů a amplituda membránové formy karotenoidů se po píku vrací do původních hodnot a následuje její pokles (tj. úbytek koncentrace karotenoidů v membránách).
- Když okolo 50 h dochází k opětovnému nárůstu množství karotenoidů a zrychlení syntézy MK, vzroste doba života membránových karotenoidů a dojde také k zastavení poklesu jejich amplitudy, ta posléze začne vzrůstat (tj. hromadí se více

karotenoidů v membránách). Obdobně roste amplituda granulárních karotenoidů a jejich doba života.

- S koncem spotřeby báze klesá doba života koenzymů, krátce poté je zjevně dosaženo konstantního reziduálního stavu v koncentraci glukózy. Pokles doby života odpovídá vyššímu zastoupení redukované formy, která v tomto období zřejmě vzniká při odbourávání MK.

Pro *Sporobolomyces shibatanus*:

- S počátkem exponenciální fáze končí stagnace doby života membránových karotenoidů a začíná po kratším zvýšení klesat, stejně jako je tomu v případě amplitudy této formy karotenoidů. Mezitím klesá doba života granulární formy (snižuje se viskozita granulí, granule se rozvolňují, zpřístupňují), zatímco její amplituda stagnuje. Koenzymy se drží v určitém stavu (doba života stagnuje), zatímco jejich množství (amplituda) vzrůstá.
- S koncem exponenciální fáze končí pokles amplitudy membránových karotenoidů (odteď jich bude více, tj. buňky si do membrány připravují antioxidační systémy), zároveň zastavuje pokles doby života granulární formy a dochází k počátku akumulace lipidů.
- Když dochází ke konci režimu rychlé nelineární spotřeby glukózy, dochází k poklesu amplitudy (koncentrace) koenzymů. Končí pokles doby života membránových karotenoidů (končí rozvolňování membrány) a zvyšování jejich amplitudy, nastává stagnace amplitudy (již se v membránách nehromadí). Zato dochází k vzestupu amplitud granulární formy, tedy nově vzniklé karotenoidy jsou směřovány do granulí.
- Od přechodu na lineární spotřebu glukózy se karotenoidy udržují na zhruba konstantní koncentraci, zároveň ustalo množení buněk.

Společnými prvky v těchto fermentacích byly:

- S koncem exponenciální fáze je dosaženo minimální velikosti buněk, končí pokles amplitudy membránové formy karotenoidů a v případě CC a SS se spouští syntéza zásobních lipidů.
- Na počátku kultivace CM a SS byl pozorován pokles amplitud i dob života koenzymů (u CC nejsou o koenzymech potřebná data).
- Při přepnutí na lineární spotřebu glukózy (u CC je tato od začátku, zřejmě v důsledku počáteční koncentrace glukózy) se stabilizuje množství karotenoidů, ustává množení buněk a amplituda membránových karotenoidů začíná stagnovat.
- V průběhu fermentací se ukázalo, že ukončení spotřeby báze zjevně souvisí s vyčerpáním glukózy v médiu, resp. s dosažením určité reziduální hladiny.

U CC bylo překvapivé, že ačkoli se kultura již od 43 hodiny pohybovala v oblasti reziduální koncentrace glukózy, nebyl zaznamenán žádný signifikantní pokles počtu buněk až do konce kultivace. Ovšem vzhledem k množství zásobních lipidů (cca 23 % hmoty buněk) není problém si představit, že buňky udržovala při životě právě tato velká zásoba.

Dalším zjištěním je, že průtokově cytometrická metoda dovede rozumně předpovídat množství karotenoidů jen do doby, než tyto začnou být akumulovány v granulích, tj. dokud je zaznamenávána jen fluorescencce karotenoidů z membrán buněk (ať už cytoplazmatických,

nebo vnitřních). Efekt je zřejmě způsoben tím, že excitační paprsek není schopen proniknout do hlubších oblastí granulí, příp. pokud ano, tak nestálá povaha excitovaného stavu karotenoidů v „roztokové“ formě v lipidických granulích, charakteristická nízkými kvantovými výtěžky a krátkou dobou života, v kombinaci s nutností průniku emitovaného záření ven z granule způsobí zcela zásadní ztrátu signálu. Pak je v podstatě zaznamenáván jen signál fluorescence karotenoidů v membránách. Analogicky lze tímto efektem vysvětlit problémy při pokusu stanovit množství lipidů pomocí Nilské červeně (příp. jakéhokoli jiného barviva).

Na závažnost tohoto efektu má vliv i fakt, že dle FLIM karotenoidy přítomné v lipidických granulích zcela dominují celkovému množství karotenoidů (> 80 %) – to činí průtokovou cytometrii ve chvílích ukládání karotenoidů do granulí zcela nevhodnou metodou.

Rozptylová metoda určení lipidů na průtokovém cytometru má určitou platnost, ovšem je závislá na specifických vnitrobuněčné stavby daného druhu kvasinek, proto lze uvažovat nejvýše o sestrojení kalibrační křivky pro daný druh. Tato kalibrace by mohla být používána (a ověřena) v pozdějších měřeních prováděných na daném druhu karotenogenních kvasinek. Problematické je ovšem stanovení lipidů v pozdních fázích kultivace, tj. po vyčerpání uhlíkatého substrátu (což je věc z hlediska produkce nežádoucí), kdy začnou být zásobní lipidy konzumovány – nedochází k adekvátnímu poklesu hodnot získaných touto metodou.

Co se produkce karotenoidů týče, u CC dominuje torulen a torularhodin (každý zhruba 35 %), s odstupem následuje β -karoten (20 %). U CM pak zcela dominuje torularhodin (> 60 %), druhým nejzastoupenějším karotenoidem je torularhodinaldehyd (20-30 %). Pro SS je specifická kodominance torularhodinu a torularhodinaldehydu (každý zhruba 40 %). V tabulce níže je uvedeno celkové množství karotenoidů a jeho koncentrace v sušině biomasy:

Tabulka 3: Maxima karotenoidů ve fermentorových kultivacích

Karotenoidy	Množství (mg/L)	Koncentrace ($\mu\text{g/g}$)	Čas maxima (h)
<i>C. capitatum</i>	2,9	196	59
<i>C. macerans</i>	4,45	165	76
<i>S. shibatanus</i>	1,9	64	52

Pro lipidy lze sestrojit obdobnou tabulku:

Tabulka 4: Maxima mastných kyselin ve fermentorových kultivacích

Mastné kyseliny	Množství (g/L)	Koncentrace (mg/g)	Čas maxima (h)
<i>C. capitatum</i>	4,4	230	> 50
<i>C. macerans</i>	3,4	126	76
<i>S. shibatanus</i>	4,1	181	52

Z hlediska karotenoidů tedy relativně vychází nejlépe CM, ovšem až na konci kultivace. Ve srovnatelný čas s CC (v 59 h) dosáhl CM 3,4 mg/L, což je sice více, ale za cenu dvojnásobného použitého množství glukózy. Bude velmi vhodné zopakovat fermentaci CC při 60 g/L (a při pH 5,5), potažmo vyzkoušet fed-batch fermentaci CC, kdy na počátku by

bylo přítomno 30 g/L a zbývajících 30 g/L by se v několika dávkách doplňovalo do fermentoru v průběhu kultivace.

Z hlediska produkce lipidů je nejlepší výsledek opět dosažen u CC, vzhledem k získanému množství MK, dodané glukóze a době trvání fermentace k dosažení maxima.

U SS převažují (> 60 %) nenasycené MK, u CM je poměr nasycené:nenasycené vyrovnaný, kdežto v případě CC dominovala nasycená kyselina kaprylová. Vysoké zastoupení elaidové kyseliny (trans izomer kyseliny olejové) v tucích z SS i CM činí tyto tuky z výživového hlediska nezajímavými.

Oscilace amplitud a dob života karotenoidů jak v membránách, tak v granulích ukazují na aktivní přizpůsobování se buněk změnám prostředí v průběhu kultivace prostřednictvím regulace viskozity membrán a granulí. Bylo pozorováno, že ke zvýšení obsahu karotenoidů a/nebo viskozity dochází tehdy, když dochází v metabolismu k přepnutí, tedy k aktivacím určitých drah a deaktivacím jiných.

Bylo ukázáno, jak pro granule, tak pro membrány, že může současně docházet k poklesu doby života karotenoidů v těchto prostředích, zatímco amplituda (koncentrace) stoupá a vice versa. To zjevně poukazuje na to, že karotenoidy nemají příliš velký vliv na fluiditu membrány/granulí, i přes možné π - π interakce, které by vytvářely „zarážky“ omezující fluiditu (interakce mezi molekulami karotenoidů nebo mezi karotenoidy a ergosterolem). To ukazuje na jednoznačnou výhodu karotenoidů jakožto buňkám vlastních fluorescenčních sondy na viskozitu lipidických prostředí.

Snímky *C. macerans* ukazují, jak záhy po inokulaci je signál Karotenoidů I z membrán oproti inokulační kultuře zeslabený a v dalších hodinách slábnoucí. Buňky v bohatém prostředí rozvolňují membrány a soustředí se na množení. Až po jednom kultivačním dni se v lipidických granulích objevují místy karotenoidy, také začíná určité „zahušťování“ vnitrobuněčných prostor spočívající v eliminaci vakuol. V dalším průběhu stacionární fáze se membrány opět stávají zřetelně viditelnými a roste množství karotenoidů i v granulích.

Snímky SS z počátku kultivace se zásadně odlišují od CM. Buňky totiž obsahují velké množství malých granulí obsahujících karotenoidy, cytoplazmatická membrána není zřetelná a vnitrobuněčné membránové systémy jsou vidět minimálně. Po 10 h kultivační se snižuje počet lipidických granulí (a zvětšují se), zároveň jsou mnohem zřetelnější vnitrobuněčné membránové systémy. Objevily se také granule, resp. membránové systémy vyznačující se obsahem karotenoidů a současně enzymovými systémy využívajícími NAD(P). Tyto útvary jsou zřejmě vakuoly, ostatně v dalším průběhu kultivace se shlukují a vytvářejí velké útvary, kde už fluorescenci dominuje membránová forma karotenoidů. To by znamenalo zásadní rozdíl vztahu karotenoidy-vakuoly mezi rody *Cystofilobasidium* a *Sporobolomyces* – zatímco *Cystofilobasidium* vakuoly minimalizuje a nesměřuje do nich karotenoidy, u *Sporobolomyces* je tomu zřejmě naopak.

6 Závěr

- Byly studovány modelové systémy – micely a lipozomy obsahující karotenoidy s obsahem dalších modifikujících látek. Byly naznačeny závislosti mezi dobou života karotenoidů a koncentrací modifikátorů v modelových systémech. Ukázalo se, že koenzym Q10 stabilizuje excitovaný stav karotenoidů lépe než ergosterol. Na základě pozorování byla navržena existence dimerní a trimerní formy karotenoidů.
- Byla realizována kultivace přímo na stolku mikroskopu za použití průtokové komory. Byl proveden jak pokus s tekutým, tak pevným médiem. Při experimentu s průtokem média byla měřena také anizotropie, ta spolu s dobami života ukázala přechod směrem k méně organizovaným strukturám ve chvíli opouštění lag fáze. Při kultivaci na pevném médiu byly zaznamenány všechny čtyři doby života nalezené v modelových systémech, včetně dimerních (a trimerních) forem. To ukazovalo na obzvláště vysokou koncentraci karotenoidů v buňkách rostoucích na pevném médiu. Porovnání amplitud s kultivacemi ve fermentoru ukazuje přibližně 6× větší koncentraci v granulích a 40× větší koncentraci v membránách než u *S. shibatanus*.
- Při kultivaci na pevném médiu ve stacionární fázi buňky soustředí karotenoidy přednostně do membrán, zatímco při kultivaci v tekutém médiu do granulí. V zacházení s karotenoidy v průběhu vývoje kultury jsou si však buňky kultivované na pevném a tekutém médiu podobné: v exponenciální fázi koncentrace karotenoidů klesá, s příchodem stacionární fáze začínají být akumulovány. Jakmile jsou živiny vyčerpány, začínají být konzumovány zásobní lipidy, s čímž souvisí rozvolnění struktur lipidických granulí – to se projeví snížením doby života karotenoidů v těchto strukturách.
- Při fermentorových kultivacích byly nalezeny tři fáze akumulace karotenoidů. První začíná s koncem exponenciální fáze a během ní jsou karotenoidy ukládány v membránách. Druhá fáze je fáze plató, kdy se množství karotenoidů v buňkách nemění nebo jen mírně stoupá. Třetí fáze, nastávající v blízkosti vyčerpání živin, je charakterizována silnou karotenogenezí, přičemž akumulace probíhá do lipidických granulí.
- Oproti tomu zásobní triacylglyceroly jsou od konce exponenciální fáze syntetizovány v podstatě konstantní rychlostí.
- Ukázalo se že zpomalování a zastavení spotřeby báze v určitém smyslu odpovídá vyčerpávání glukózy v médiu. Lze ho tak použít pro orientaci při řízení procesu namísto drahých přístrojů pro on-line měření glukózy.
- Byla nalezena omezení metod využívající fluorescence pro stanovení lipidů a karotenoidů s pomocí průtokového cytometru. Omezení nastává, jsou-li fluorofory přednostně lokalizovány do lipidických granulí – molekuly ve vnitřních vrstvách zůstávají neexcitovány nebo jejich fluorescence neopustí granuli, takže výsledné množství zaznamenané fluorescence je dáno molekulami barviva na povrchu, čímž dochází ke zkreslení odhadu množství.
- Rozptylová metoda pro stanovení lipidů na průtokovém cytometru vyžaduje kalibraci pro každý druh. Její platnost je omezena na období, kdy buňky mají k dispozici dostatek substrátu v prostředí a nedochází tedy ke konzumaci zásobních lipidů.

- Hlavním karotenoidem dominujícím v průběhu fermentací byl torularhodin. U *S. shibatanus* a *C. macerans* pak bylo i vysoké zastoupení torularhodinaldehydu.
- Ze tří studovaných organismů, vybraných na základě předchozí laboratorní zkušenosti s jejich produkčními schopnostmi, se jako nejnadějnější pro produkci lipidů i karotenoidů jeví *C. capitatum*.
- Byly pozorovány oscilace amplitud a dob života karotenoidů v membránách i v granulích. Zvyšování obsahu karotenoidů a/nebo viskozity dochází tehdy, když dochází v metabolismu k přepnutí nastavení (metabolic switch) – dochází k aktivnímu přizpůsobování se buněk změnám prostředí v průběhu kultivace prostřednictvím regulace viskozity membrán a granulí. Dochází tak k ochraně klíčových enzymatických systémů před oxidačním i jiným stresem.
- Bylo poukázáno na zřetelné morfologické rozdíly mezi zkoumanými druhy karotenogenních kvasinek – zatímco *C. capitatum* má menší množství velkých granulí, *C. macerans* a *S. shibatanus* se vyznačují distribucí zásobních lipidů do většího množství menších granulí. U *S. shibatanus* bylo na počátku kultivace pozorováno opravdu vysoké množství malých granulí. *S. shibatanus* se také odlišuje zacházením s vakuolami – ponechává si je, zatímco u rodu *Cystofilobasidium* dochází v průběhu vývoje kultury k jejich minimalizaci.

7 Bibliografie

- [1] WALKER, Graeme. *Yeast physiology and biotechnology*. 1st ed. New York: J. Wiley, 1998. ISBN 04-719-6447-6.
- [2] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [3] ARAI, M, T LEE a S MURAO. Substrate specificity of the *Penicillium lilacinum* enzymatic to the cell wall of *Rhodotorula glutinis* and the structure of the *Rhodotorula* cell wall glucomannan. *Current Microbiology*. 1978, **1**(1), 185-188.
- [4] AJAY KUMAR, . *Bioseparation engineering: a comprehensive DSP volumen*. 1st ed. New Delhi: I. K. International Publishing House, 2009. ISBN 978-938-0026-084.
- [5] VENKATESWARAN, G. *Lipid modification in Rhodotorula Gracilis: biochemical and genetic studies: Thesis*. Indie: University of Mysore, 1997.
- [6] RADULOVIC, Maja, Oskar KNITTELFELDER, Alvaro CRISTOBAL-SARRAMIAN, Dagmar KOLB, Heimo WOLINSKI a Sepp KOHLWEIN. The emergence of lipid droplets in yeast: current status and experimental approaches. *Current Genetics* [online]. 2013, **59**(4), 231-242 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1007/s00294-013-0407-9. ISSN 01728083. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00294-013-0407-9>
- [7] FEI, W, G SHIU, Y ZHANG, N KRAHMER a C FERGUSON. A Role for Phosphatidic Acid in the Formation of “Supersized” Lipid Droplets. *PLoS Genetics*. 2011, **7**(7), 1002201.
- [8] MAROVA, Ivana, Martina CARNECKA, Andrea HALIENOVA, Emilia BREIEROVA a Radka KOČI. Production of Carotenoid-/Ergosterol-Supplemented Biomass by Red Yeast *Rhodotorula glutinis* Grown Under External Stress. *Food Technology and Biotechnology*. 2010, **48**(1), 56-61.
- [9] FRENGOVA, Ginka a Dora BESHKOVA. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 2009, **36**(2), 163-180 [cit. 2016-07-17]. DOI: 10.1007/s10295-008-0492-9. ISSN 13675435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-008-0492-9>
- [10] JOHNSON, Eric. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the basidiomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, **97**(17), 7563-7577. DOI: 10.1007/s00253-013-5046-z. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-013-5046-z>
- [11] COHEN, Zvi a Colin. RATLEDGE. *Single cell oils: microbial and algal oils*. 2nd ed. Urbana, Ill.: AOCS Press, 2010. ISBN 978-189-3997-738.
- [12] Biotechnological Production and Properties of Carotenoid Pigments. ČERTÍK, M a ET AL. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*. 1. Boca Raton: CRC Press, 2009, s. 355-375. ISBN 978-1-4200-7703-2.
- [13] HAINAL, AR a ET AL. Lignin as a carbon source for the cultivation of some

- Rhodotorula species. *Cellulose Chemistry and Technology*. 2012, **46**(1-2), 87-96.
- [14] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, Anna. *Taxonómia kvasiniek a kvasinkových mikroorganizmov*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1990. ISBN 80-050-0644-6.
- [15] JOHNSON, Eric. Phaffia rhodozyma: colorful odyssey. *International Microbiology*. 2003, **6**(3), 169-174. DOI: 10.1007/s10123-003-0130-3. ISSN 1139-6709. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10123-003-0130-3>
- [16] SINGH, Gajendra, Giovanni VOLPE, Caitriona CREELY, Helga GRÖTSCH, Isabel GELI a Dmitri PETROV. The lag phase and G1 phase of a single yeast cell monitored by Raman microspectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2006, **37**(8), 858-864. DOI: 10.1002/jrs.1520. ISSN 0377-0486. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.1520>
- [17] BREJNING, Jeanette a Lene JESPERSEN. Protein expression during lag phase and growth initiation in Saccharomyces cerevisiae. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, **75**(1-2), 27-38. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00726-7. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501007267>
- [18] BUCHANAN, RL a M SOLBERG. Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of Staphylococcus aureus. *Journal of Food Science*. 1972, **37**(1), 81-85.
- [19] PIRT, SJ. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. New York: Blackwell Scientific Publications, 1975.
- [20] SWINNEN, I. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **94**(2), 137-159. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006. ISSN 01681605. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504000698>
- [21] SMELT, Jan, Gertjan OTTEN a Ad BOS. Modelling the effect of sublethal injury on the distribution of the lag times of individual cells of Lactobacillus plantarum. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, **73**(1), 207-212. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00651-1. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006511>
- [22] YOUNG, Andrew a Gordon LOWE. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2001, **385**(1), 20-27. DOI: 10.1006/abbi.2000.2149. ISSN 00039861. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986100921490>
- [23] BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*. 1995, **9**(15), 1551-1558.
- [24] ERDMAN, JW. Variable bioavailability of carotenoids from vegetables,. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1999, **70**(2), 179-180.
- [25] NELIS, H. a A. LEENHEER. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*. 1991, **70**(3), 181-191. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1991.tb02922.x.
- [26] POOL-ZOBEL, BL a ET AL. Consumption of vegetables reduces genetic damage in

- humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*. 1997, **18**(9), 1847-1850.
- [27] GOODMAN, G., M. THORNQUIST, J. BALMES, M. CULLEN, F. MEYSKENS, G. OMENN, B. VALANIS a J. WILLIAMS. The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: Incidence of Lung Cancer and Cardiovascular Disease Mortality During 6-Year Follow-up After Stopping -Carotene and Retinol Supplements. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2004, **96**(23), 1743-1750. DOI: 10.1093/jnci/djh320.
- [28] MEZZOMO, Natália, Laura TENFEN, Mirelle FARIAS, Maria FRIEDRICH, Rozangela PEDROSA a Sandra FERREIRA. Evidence of anti-obesity and mixed hypolipidemic effects of extracts from pink shrimp (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) processing residue. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2015, **96**, 252-261. DOI: 10.1016/j.supflu.2014.09.021. ISSN 08968446. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844614002988>
- [29] IRIMIA-VLADU, Mihai, Eric. GŁOWACKI, Gundula VOSS, Siegfried BAUER a Niyazi SARICIFTCI. Green and biodegradable electronics. *Materials Today* [online]. 2012, **15**(7-8), 340-346 [cit. 2016-07-17]. DOI: 10.1016/S1369-7021(12)70139-6. ISSN 13697021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369702112701396>
- [30] IRIMIA-VLADU, Mihai, Pavel TROSHIN, Melanie REISINGER et al. Environmentally sustainable organic field effect transistors. *Organic Electronics* [online]. 2010, **11**(12), 1974-1990 [cit. 2016-07-17]. DOI: 10.1016/j.orgel.2010.09.007. ISSN 15661199. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566119910003010>
- [31] WANG, Xiao-Feng, Li WANG, Zhongqiang WANG, Yuwei WANG, Naoto TAMAI, Ziruo HONG a Junji KIDO. Natural Photosynthetic Carotenoids for Solution-Processed Organic Bulk-Heterojunction Solar Cells. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2013, **117**(2), 804-811. DOI: 10.1021/jp309773b. ISSN 1932-7447. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp309773b>
- [32] LI, J, JK TOMFOHR a OF SANKEY. Theoretical study of carotene as a molecular wire. *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*. 2003, **19**(1), 133-138.
- [33] VISOLY-FISHER, I a ET AL. Conductance of a biomolecular wire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(23), 8686-8690.
- [34] GALE, CR a ET AL. Antioxidant vitamin status and carotid atherosclerosis in the elderly. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2001, **74**(3), 402-408.
- [35] OSGANIAN, SK a ET AL. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003, **77**(6), 1390-1399.
- [36] RAO, A. a Sanjiv AGARWAL. Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000, **19**(5), 563-569. DOI: 10.1080/07315724.2000.10718953. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2000.10718953>
- [37] CLINTON, Steven. Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. *Nutrition reviews*. 1998, **56**(2), 35-51. DOI: 10.1111/j.1753-4887.1998.tb01691.x. Dostupné také z:

<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01691.x>

- [38] RAO, A. Lycopene, Tomatoes, and the Prevention of Coronary Heart Disease. *Experimental Biology and Medicine*. 2002, **227**(10), 908-913. DOI: 10.1177/153537020222701011. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/153537020222701011>
- [39] CRAMER, Daniel, Hannah KUPER, Bernard HARLOW a Linda TITUS-ERNSTOFF. Carotenoids, antioxidants and ovarian cancer risk in pre- and postmenopausal women. *International Journal of Cancer*. 2001, **94**(1), 128-134. DOI: 10.1002/ijc.1435. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.1435>
- [40] MOELLER, SM a ET AL. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. *Journal of the American College of Nutrition*. 2000, **19**(5), 522-527.
- [41] WATHNE, Einar, Bjørn BJERKENG, Trond STOREBAKKEN, Vidar VASSVIK a Anne ODLAND. Pigmentation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed astaxanthin in all meals or in alternating meals. *Aquaculture*. 1998, **159**(3-4), 217-231. DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00218-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848697002184>
- [42] LOPEZ, M. Selective extraction of astaxanthin from crustaceans by use of supercritical carbon dioxide. *Talanta*. 2004, **64**(3), 726-731. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.03.048. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914004001857>
- [43] CERTIK, Milan a Sakayu SHIMIZU. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1999, **87**(1), 1-14. DOI: 10.1016/S1389-1723(99)80001-2. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172399800012>
- [44] CHEIRSILP, Benjamas a Yasmi LOUHASAKUL. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. *Bioresource Technology*. 2013, **142**(1), 329-337. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852413007724>
- [45] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [46] SALWAY, J. *Metabolism at a glance*. 3rd ed. Malden, Mass.: Blackwell Pub., 2004. ISBN 978-1405107167.
- [47] LAKOWICZ, Joseph. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 03-873-1278-1.
- [48] AUBIN, J. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *Journal of Histochemistry*. 1979, **27**(1), 36-43. DOI: 10.1177/27.1.220325. ISSN 0022-1554. Dostupné také z: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/27.1.220325>
- [49] BENSON, R., R. MEYER, M. ZARUBA a G. MCKHANN. Cellular autofluorescence-- is it due to flavins?. *Journal of Histochemistry*. 1979, **27**(1), 44-48. DOI:

- 10.1177/27.1.438504. ISSN 0022-1554. Dostupné také z: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/27.1.438504>
- [50] ISLAM, Md., Masato HONMA, Takakazu NAKABAYASHI, Masataka KINJO a Nobuhiro OHTA. PH Dependence of the Fluorescence Lifetime of FAD in Solution and in Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, **14**(1), 1952-1963. DOI: 10.3390/ijms14011952. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/1/1952/>
- [51] SCHNECKENBURGER, Herbert. Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators. *Optical Engineering*. 1992, **31**(7), 1447-. DOI: 10.1117/12.57704. ISSN 00913286. Dostupné také z: <http://opticalengineering.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/12.57704>
- [52] KANDORI, Hideki, Hiroyuki SASABE a Mamoru MIMURO. Direct Determination of a Lifetime of the S2 State of .beta.-Carotene by Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1994, **116**(6), 2671-2672 [cit. 2016-07-17]. DOI: 10.1021/ja00085a078. ISSN 00027863. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00085a078>
- [53] KASHA, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society*. 1950, **9**, 14-19.
- [54] Konfokální laserová rastrovací mikroskopie (CLSM). *Chempoint: Vědci pro průmysl a praxi* [online]. Brno: Vysoké Učení Technické v Brně, 2011 [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/konfokalni-laserova-rastrovaci-mikroskopie-clsm>
- [55] WASIELEWSKI, Michael a Lowell KISPERS. Direct measurement of the lowest excited singlet state lifetime of all-trans- β -carotene and related carotenoids. *Chemical Physics Letters*. 1986, **128**(3), 238-243. DOI: 10.1016/0009-2614(86)80332-3. ISSN 00092614. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0009261486803323>
- [56] HÁRONIKOVÁ, Andrea. *Produkce vybraných kvasinkových metabolitů využitelných do potravinových doplňků*. Brno, 2014. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Doc. RNDr. Ivana Márová, Csc.
- [57] RAHMAN, Misha. BIO-RAD LABORATORIES INC. *Introduction to Flow Cytometry* [online]. 1. Kidlington: AbD Serotec, 2014 [cit. 2015-02-09].
- [58] MALACRINÒ, Paola, Giacomo ZAPPAROLI, Sandra TORRIANI a Franco DELLAGLIO. Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*. 2001, **45**(2), 127-134. DOI: 10.1016/S0167-7012(01)00243-3. ISSN 01677012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701201002433>
- [59] ATTFIELD, P.V., S. KLETSAS, D.A. VEAL, R. VAN ROOIJEN a P.J.L. BELL. Use of flow cytometry to monitor cell damage and predict fermentation activity of dried yeasts. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, **89**(2), 207-214. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01100.x. ISSN 1364-5072. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2672.2000.01100.x>
- [60] JESPERSEN, L a M JAKOBSEN. Use of flow cytometry for rapid estimation of

- intracellular events in brewing yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*. 1994, **100**(6), 399-403.
- [61] CALVERT, Meredith, Joanne LANNIGAN a Lucy PEMBERTON. Optimization of yeast cell cycle analysis and morphological characterization by multispectral imaging flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2008, **73**(9), 825-833. DOI: 10.1002/cyto.a.20609. ISSN 15524922. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.20609>
- [62] CHEN, Jun, Mark CARTER, Bruce EDWARDS, Hong CAI a Larry SKLAR. High throughput flow cytometry based yeast two-hybrid array approach for large-scale analysis of protein-protein interactions. *Cytometry Part A*. 2012, **81**(1), 90-98. DOI: 10.1002/cyto.a.21144. ISSN 15524922. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.a.21144>
- [63] FREITAS, Cláudia, Beatriz NOBRE, Luísa GOUVEIA, José ROSEIRO, Alberto REIS a Teresa LOPES DA SILVA. New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry*. 2014, **49**(4), 554-562. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.01.022. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511314000634>
- [64] CUTZU, Raffaella, Ana CLEMENTE, Alberto REIS, Beatriz NOBRE, Ilaria MANNAZZU, José ROSEIRO a Teresa LOPES DA SILVA. Assessment of β -carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutant 400A15 using flow cytometry. *Journal of Industrial Microbiology*. 2013, **40**(8), 865-875. DOI: 10.1007/s10295-013-1278-2. ISSN 1367-5435. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-013-1278-2>
- [65] SCHLEE, Cornelia, Michaela MIEDL, Kenneth LEIPER a Graham STEWART. The Potential of Confocal Imaging for Measuring Physiological Changes in Brewer's Yeast. *Journal of the Institute of Brewing* [online]. 2006, **112**(2), 134-147 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2006.tb00243.x. ISSN 00469750. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00243.x>
- [66] MURPHY, D. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research* [online]. 2001, **40**(5), 325-438 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1016/S0163-7827(01)00013-3. ISSN 01637827. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782701000133>
- [67] MURPHY, Samantha, Sally MARTIN a Robert PARTON. Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* [online]. 2009, **1791**(6), 441-447 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1016/j.bbalip.2008.07.004. ISSN 13881981. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198108001315>
- [68] FUJIMOTO, Toyoshi, Yuki OHSAKI, Jinglei CHENG, Michitaka SUZUKI a Yuki SHINOHARA. Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. 2008, **130**(2), 263-279 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1007/s00418-008-0449-0. ISSN 09486143. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-008-0449-0>

- [69] RANI, S., S. SAHA a R. RAJASEKHARAN. A soluble diacylglycerol acyltransferase is involved in triacylglycerol biosynthesis in the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis*. *Microbiology* [online]. 2012, **159**(1), 155-166 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1099/mic.0.063156-0. ISSN 13500872. Dostupné z: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.063156-0>
- [70] AN, G.-H., O.-S. SUH, H.-C. KWON, K. KIM a E.A. JOHNSON. Quantification of carotenoids in cells of *Phaffia rhodozyma* by autofluorescence. *Biotechnology Letters* [online]. 2000, **22**(12), 1031-1034 [cit. 2016-09-26]. DOI: 10.1023/A:1005614010003. ISSN 01415492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1005614010003>
- [71] FANG, Tony a Joh-Ming WANG. Extractability of astaxanthin in a mixed culture of a carotenoid over-producing mutant of *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Bacillus circulans* in two-stage batch fermentation. *Process Biochemistry*. 2002, **37**(11), 1235-1245. DOI: 10.1016/S0032-9592(02)00011-0. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959202000110>
- [72] STOREBAKKEN, Trond, Mette Sørensen, Bjørn BJERKENG a Stephen HIU. Utilization of astaxanthin from red yeast, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of enzymatic cell wall disruption and feed extrusion temperature. *Aquaculture*. 2004, **236**(1-4), 391-403. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.10.035. ISSN 00448486. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848603007373>
- [73] LIM, Gio-Bin, Sang-Yun LEE, Eun-Kyu LEE, Seung-Joo HAAM a Woo-Sik KIM. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. *Biochemical Engineering Journal*. 2002, **11**(2-3), 181-187. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00023-2. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X02000232>
- [74] Production of Torularhodin, Torulene, and β -Carotene by *Rhodotorula* Yeasts. *Microbial carotenoids from fungi: methods and protocols*. 1. New York: Humana Press, 2012, s. 275-283. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 898. ISBN 978-1-61779-917-4.
- [75] PARK, P.K., E.Y. KIM a K.H. CHU. Chemical disruption of yeast cells for the isolation of carotenoid pigments. *Separation and Purification Technology*. 2007, **53**(2), 148-152. DOI: 10.1016/j.seppur.2006.06.026. ISSN 13835866. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383586606003224>
- [76] MEIRELES, M. Angela. Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2003, **7**(4-5), 321-330. DOI: 10.1016/j.cossms.2003.10.008. ISSN 13590286. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359028603000949>
- [77] HAWTHORNE, SB a DJ MILLER. Extraction and recovery of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solids using supercritical fluids. *Analytical Chemistry*. 1987, **59**(19), 1705-1708.
- [78] MENDES, Rui, Helena FERNANDES, JoséP. COELHO, Elsa REIS, Joaquim CABRAL, Júlio NOVAIS a António PALAVRA. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and

- other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*. 1995, **53**(1), 99-103. DOI: 10.1016/0308-8146(95)95794-7. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0308814695957947>
- [79] MENDES, Rui, Beatriz NOBRE, Miguel CARDOSO, Ana PEREIRA a António PALAVRA. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*. 2003, **356**, 328-334. DOI: 10.1016/S0020-1693(03)00363-3. ISSN 00201693. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169303003633>
- [80] DUPONT, Sebastien, Laurent BENEY, Thierry FERREIRA a Patrick GERVAIS. Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2011, **1808**(6), 1520-1528. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.11.012. ISSN 00052736. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273610003858>
- [81] SHARMA, Sukesh. Implications of sterol structure for membrane lipid composition, fluidity and phospholipid asymmetry in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 2006, **6**(7), 1047-1051. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00149.x. ISSN 15671356. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsyr/article-lookup/doi/10.1111/j.1567-1364.2006.00149.x>
- [82] SWAN, Tracey a Kenneth WATSON. Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiology Letters*. 1998, **169**(1), 191-197. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13317.x. ISSN 03781097. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13317.x>
- [83] SUOMALAINEN, H a H LEHTONEN. The production of aroma compounds by yeast. *Journal of the Institute of Brewing*. 1979, **85**(3), 149-156.
- [84] VANĚK, Martin. *Využití vybraných fluorescenčních technik k charakterizaci mikrobiálních buněk*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vedoucí práce Prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
- [85] RYCHTERA, M a J PÁCA. *Bioinženýrství kvasných procesů*. 1. Praha: SNTL, 1985.
- [86] JOHNSON, I. a M. DAVIDSON. Jablonski energy diagram. In: *Microscopy Resource Center* [online]. 2012 [cit. 2015-02-06]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/>

8 Seznam použitých zkratek

- AcCoA – acetylkoenzym A
ACP – acyl carrier protein, přenašeč acylové skupiny
ATP – adenosintrifosfát
BP – band pass, filtr propouštějící záření v rozmezí určitých vlnových délek
BS – buněčná stěna
CC – *Cystofilobasidium capitatum*
CM – *Cystofilobasidium macerans*
CoA – koenzym A
DOT – dissolved oxygen tension, tlak rozpuštěného kyslíku, udává se v % nasycení
FAS – fatty acid synthase, syntáza mastných kyselin
FCS – fluorescenční korelační spektroskopie
FL1, FL2, apod. - fluorescenční kanál (na průtokovém cytometru), číslo udává oblast vlnových délek emise
FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, mikroskopie zobrazující pomocí dob života
GFP – Green Fluorescent Protein, zeleně fluoreskující protein
HMG-CoA – β -hydroxymethylglutarylkoenzym A
HPLC – High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LALS, též SSC – large angle light scattering (též side scatter), boční rozptyl
LB – lipid bodies, lipidická tělíska, též LD
LD – lipid droplets, lipidické kapky
LP – long pass, filtr propouštějící veškeré záření s vlnovou délkou větší než určitá hodnota
LSCM – Laser Scanning Confocal Microscopy, laserová skenovací konfokální mikroskopie
MFI – Mean Fluorescence Intensity, střední hodnota fluorescence
MK – mastné kyseliny
MVA – mevalonic acid, kyselina mevalonová
NAD, resp. NADH – nikotinamidadenindinukleotid, resp. jeho redukovaná forma
NADP, resp. NADPH - nikotinamidadenindinukleotidfosfát, resp. jeho redukovaná forma
NR – Nile Red, fluorescenční barvivo nilská červeň
RGB – red, green, blue; aditivní model míchání barev
RP HPLC – reverse phase HPLC, HPLC na reverzní (obrácené) fázi
SALS, též FSC – small angle light scattering (též forward scatter), rozptyl v přímém směru
SDS – sodium dodecylsulphate, dodecylsulfát sodný
SS – *Sporobolomyces shibatanus*
TCSPC – Time Correlated Single Photon Counting, časově rozlišené čítání fotonů

9 Příloha 1

Synchronní děje v průběhu fermentací

Cystofilobasidium capitatum:

hodina	děj	další pozn	množení	redox	glukóza	karotenoidy	MK	Karotenoidy I	Karotenoidy II	Koenzymy
2	1,2 h skok turbidity; 1,4 h prudký vzestup otáček							výrazný nárůst doby života	pokles amplitud y	
4	4,25 h zlom redox		exponenc iální							
6										
8										
10										
12		11 h zlom redox						pokles	vzestup	
14										
16								stagnace		
18						intenzivní syntéza				
20	stabilizace otáček									
22										
24										
26										
28										
30										
32										
34										
36	začíná pokles otáček									
38										
40										
42			stacionár ní fáze		42,6 h zlom					
44										
46	45 h konec báze a zlom redox, 46 h začátek kyseliny									
48										
50										
52										
54										
56										
58										
60										
62										
64										
66										
68										
70										
72										
74										
76										

Cystofilobasidium macerans:

hodina	děj	další pozn	množení	redox	glukóza	karotenoidy	MK	Karotenoidy I		Karotenoidy II		Koenzymy	
2	po 1 h končí konst. Redox, začíná pokles												
4	po 3 h prudký vzestup otáček												
6	6,5 výchylna nahoru na redoxu, poté pokles		udržování počtu buněk										nepatrný pokles amplitudy
8													
10			exponenciální fáze		rychlá konzumace glukózy								
12	do 12,5 klesá velikost, poté roste												
14													
16													
18													
20													
22													
24													
26													
28													
30													
32													
34													
36													
38													
40													
42													
44													
46													
48													
50													
52													
54													
56													
58													
60													
62													
64													
66	ukončení spotřeby báze												
68													
70													
72													
74													
76													

Sporobolomyces shibatanus:

hodina	děj	další pozn	množení	redox	glukóza	karotenoidy	MK	Karotenoidy I		Karotenoidy II		Koenzymy	
2			kolísání, stagnace					stagnace doby života	pokles amplitudy	vzestup doby života	pokles amplitudy	pokles	pokles
4									náhlý vzestup				
6													
8													
10			exponenciální fáze		rychlá spotřeba glukózy								mírný vzestup amplitudy
12													
14													
16													
18													
20	konec dávkování báze 20,5 h												
22													
24													
26			zpomalené množení		zpomalující								
28													
30	výpadek vzdušnění na 20 minut												
32													
34													
36													
38													
40													
42													
44													
46													
48													
50													
52													
54													
56													
58													
60													
62													
64													
66													
68													
70													
72													
74													
76													
78													
80													